ISOENZYME DER TRIOSEPHOSPHAT ISOMERASE IN DEN BLÄTTERN VON SECALE CEREALE L.

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
Abteilung für Biologie
an der
Ruhr-Universität Bochum

von
Hans-Georg Kurzok
aus Düsseldorf

Bochum 1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544708_0018

ISOENZYME DER TRIOSEPHOSPHAT ISOMERASE IN DEN BLÄTTERN VON SECALE CEREALE L.

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
Abteilung für Biologie
an der
Ruhr-Universität Bochum

von
Hans-Georg Kurzok
aus Düsseldorf

Bochum 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Referent: Prof. Dr. J. Feierabend

2. Referent: Prof. Dr. R.J. Berzborn

eingereicht am 16. November 1981

ABKÜRZUNGEN

AcA 44	Acrylamid : Agarose (4:4)
Cp-TIM	Chloroplastenform der Triosephosphat Isomerase
Cyto-TIM	Cytoplasmatische Form der Triosephosphat Isomerase
DAP	Dihydroxyacetonphosphat
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
FBP	Fructose-1,6-Bisphosphat
FG	Frischgewicht
x g	mehrfaches der Erdbeschleunigung
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
h	Stunde
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP	Isoelektrischer Punkt
KD	Kilodalton
mA	Milliampère
MET	Mercaptoäthanol
min	Minute
mS	Millisiemens
MW	Molekulargewicht
NAD(P)(H)	Nikotinamidadenindinukleotid (Phosphat) (reduziert)
NBT	Nitroblautetrazolium
nm	Nanometer
PMS	Phenanzinmetosulfat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon, Polyklar AT
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SDS	Natrium(Sodium)-Dodecyl-Sulfat
TCA	Trichloressigsäure
TIM	Triosephosphat Isomerase
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UpM	Umdrehung pro Minute
V	Volt

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite:
	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	
I.	EINLEITUNG	1
II.	MATERIAL UND METHODEN	12
1.	Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen	12
2.	Herstellen zellfreier Extrakte	14
3.	Reinigungs- und Trennverfahren	14
3.1	Ammoniumsulfatfällungen	14
3.2	Säurefällungen	15
3.3	Anionenaustauscherchromatographie	16
3.4	Gelfiltration	17
3.5	"Salting-Out"-Chromatographie	18
3.6	Polyacrylamidgelelektrophorese	19
3.6.1	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese	20
3.6.2	Nicht-denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese	22
3.7	Darstellung der Proteine und Peptide nach Polyacrylamidgelelektrophorese	22
3.7.1	Färbung mit Coomassie Brilliant Blue G-250	22
3.7.2	Schnellfärbemethode	22
3.7.3	Darstellung mit 1 M KCl	23
3.7.4	Aktivitätsfärbung der Triosephosphat Isomerase	24
3.7.5	Aufzeichnung der Absorptionsprofile	24
3.7.6	Nachweis von Glykoproteinen	25
3.7.6.1	Perjodsäure-Schiff-Färbung	25
3.7.6.2	Dansylhydrazin-Färbung	26
3.7.6.3	Thymol-Schwefelsäure-Färbung	27

3.7.7	Partielle Hydrolysen der Isoenzymproteine	27
3.7.7.1	Bromcyan-Spaltung	28
3.7.7.2	Partielle Hydrolyse mit Staphylococcus aureus V8-Protease und Papain	29
3.8	Isoelektrische Fokussierung	29
3.9	Saccharosegradientenzentrifugation	31
4.	Bestimmungsmethoden	32
4.1	Bestimmung von Enzymaktivitäten	32
4.2	Proteinbestimmung	33
4.3	Bestimmung der Saccharosekonzentration	34
4.4	Bestimmung der Leitfähigkeit	34
5.	Immunologische Untersuchungen	35
5.1	Herstellen der Antiseren	35
5.2	Reinigung der Antiseren	36
5.3	Puffersystem	36
5.4	Einfach-Immunodiffusion	37
5.5	Doppeldiffusion	38
5.6	Immunelektrophorese	38
5.7	Gekreuzte Immunelektrophorese	38
III.	VERSUCHE UND ERGEBNISSE	40
1.	Trennung, Reinigung und Präparation der Triosephosphat Isomerase-Isoenzyme	40
1.1	Fällungsmethoden	41
1.1.1	Ammoniumsulfatfällungen	41
1.1.2	Säurefällungen	41
1.1.3	andere Fällungen	44
1.2	Säulenchromatographische Methoden	45
1.2.1	Anionenaustauscherchromatographie	45
1.2.2	Gelfiltration an Ultrogel AcA 44	48
1.2.3	"Salting-Out"-Chromatographie	50
1.2.4	andere Verfahren	53
1.3	Gelelektrophoretische Reinigung	54

1.3.1	Aktivitätsfärbung	56
1.4	Zusammenfassende Darstellung des Reinigungsverfahrens und Reinigungstabelle	58
2.	Charakterisierung der gereinigten Isoenzyme	62
2.1	Isoelektrische Fokussierung	62
2.2	Molekulargewichtsbestimmung	65
2.3	Nachweis von Glykoproteinen	73
2.4	Immunologische Charakterisierung	77
2.4.1	Spezifität der Antiseren gegen die Formen der Triosephosphat Isomerase	78
2.4.2	Vergleichende Immunelektrophoresen und Spezifität der Antiseren	82
2.5	Vergleich der Polypeptide nach partieller Hydrolyse	85
3.	Entwicklung der Triosephosphat Isomerase-Isoenzyme	108
4.	Vergleich der Triosephosphat Isomerase verschiedener Organismen	119
IV.	DISKUSSION	124
V.	ZUSAMMENFASSUNG	138
VI.	LITERATURNACHWEISE	141

I. EINLEITUNG

Seit annähernd 30 Jahren ist das Vorkommen von Enzymen mit gleicher Wirkungsspezifität bekannt. Neilands demonstrierte 1952 an zwei elektrophoretisch getrennten Fraktionen Lactat-Dehydrogenase-Aktivität. Es gelang ihm, beide Formen des Enzyms zu kristallisieren. Bis 1959 wurden auch die drei Heterotetramere der Lactat-Dehydrogenase nachgewiesen (vgl. Markert, 1977). Mit der Verbesserung biochemischer Auftrennungsmöglichkeiten wurde eine Vielzahl von Enzymen bekannt, die ebenfalls in mehreren Formen aktiv dargestellt werden konnten. Zur genaueren Definition isofunktioneller Proteine, die aus einer Art isoliert werden können, führten Markert und Møller (1959) den Begriff "Isozym" ≙ "Isoenzym" in den Sprachgebrauch ein. Die Commission on Biochemical Nomenclature of the International Union of Biochemistry (CBN-IUB 1977) empfahl jedoch, den Terminus "Isoenzym" nur zu benutzen, wenn der Nachweis erbracht wurde, daß die unterschiedlichen (trennbaren) Enzymformen durch verschiedene Gene kodiert werden. Solange der Kodierungsort unbekannt ist, sollten die isofunktionellen Enzyme als "multiple Formen" bezeichnet werden.

Drei typische Beispiele der "Isoenzyme" werden von der CBN-IUB (1977) angeführt: 1. Genetisch unabhängige Proteine werden an separaten Genen kodiert und sind wie z.B. die Malat-Dehydrogenase in Mitochondrien bzw. Cytoplasma lokalisiert. Die für die Synthese verantwortlichen Gene liegen in der Kern-DNA. Die Translationsprodukte sind sehr verschieden, katalysieren jedoch die gleiche Reaktion. 2. Es werden heteropolymere Proteine genannt, die aus verschiedenen nicht-kovalent-gebundenen Polypeptidketten unterschiedlicher Primärstruktur zusammengesetzt sind, wie die "M" und "H"-Ketten der Lactat-

Dehydrogenase. Da die Lactat-Dehydrogenase als tetrameres Protein vorliegt, ergeben sich in vivo fünf Formen gleicher Substratspezifität: zwei Homotetramere und drei Heterotetramere. 3. Die dritte Gruppe der Isoenzyme sind genetische Varianten. Sie werden an allelen Genen kodiert. Als Vertreter dieser Gruppe sind mehrere Formen der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase beschrieben worden. Sie werden als "Allelozyme" bezeichnet.

Enzymformen, die einen gemeinsamen Ursprung haben (=Produkte identischer Gene sind), können epigenetisch verändert werden. Solche sekundär modifizierten Enzymformen sollten "multiple Formen" genannt werden. Modifizierte Enzyme können durch Konformationsänderung entstehen (Kitto et al., 1966). Weitere post-translationale Veränderungen wie selektives Entfernen von Aminosäureresten, Decarboxylierung, Desaminierung, Phosphorylierung, Acetylierung und Methylierung müssen als strukturverändernde Möglichkeiten in Betracht gezogen werden (Scandalios, 1974).

Da immer neue multiple Formen aus tierischen und pflanzlichen Geweben bekannt werden, sind Untersuchungen über den genetischen Ursprung, die Verteilung in der Zelle, die physiologische Bedeutung und die Regulation der Synthese unerläßlich geworden.

Untersuchungen von Geweben unter physiologischen Gesichtspunkten haben gezeigt, daß man zwei Kategorien von Isoenzymen unterscheiden muß:
1. Nur zu bestimmten Zeiten treten Isoenzyme in Erscheinung. Ihre Lokalisierung ist eng gekoppelt mit der Funktion, die sie entweder im Cytoplasma (= nicht Organell-gebunden) oder in verschiedenen Organellen (kompartimentiert) ausüben. Das Erscheinen der Isoenzyme ist abhängig vom Differenzierungszustand, in dem sich

die Zelle befindet. Mit der Bildung und der Funktion bestimmter Organellen werden auch verschiedene Enzymformen synthetisiert. Nach Beendigung ihrer Funktion werden die Enzyme inaktiviert oder proteolytisch abgebaut.

Scandalios (1977) zeigt am Beispiel der nicht Organell-gebundenen Alkohol-Dehydrogenase aus Maisskutellum, daß zu Beginn der Keimung vier lösliche Enzymformen elektrophoretisch nachweisbar sind und nach vier Tagen nur noch ein Enzym im Cytoplasma verbleibt. Bis zur Entwicklung des fertigen Maiskorns werden wiederum alle vier Isoenzymstadien durchlaufen. Ähnliches ist für die α-Amylase-Isoenzyme aus Winterroggen (Wilp und Buschbeck, 1978) und Triticale-Samen (Daussant und Hill, 1979) beschrieben worden.
Beispiele für die zeitliche Koinzidenz zwischen dem Erscheinen glyoxysomaler Isoenzymformen und Biogenese der Glyoxysomen sind für die Katalase (Scandalios, 1974) und die glyoxysomale Malat-Dehydrogenase (Walk und Hock, 1977) beschrieben worden. Während der Entwicklung der Katalase in Maiskeimlingen wird die Aktivität nur in löslichen Fraktionen gefunden. Einige Tage nach der Keimung, wenn auch die Glyoxysomen synthetisiert werden, kann zwischen 25-30% der Gesamtaktivität der Katalase Organell-gebunden in den Glyoxysomen nachgewiesen werden. Walk und Hock (1977) konnten durch immunologische Nachweismethoden zeigen, daß mit der Funktion der Glyoxysomen im Fettabbau die glyoxysomale Malat-Dehydrogenase "de novo" synthetisiert wird. Andere Isoenzyme der Malat-Dehydrogenase liegen zur gleichen Zeit im Cytoplasma und in den Mitochondrien, und nach dem Verschwinden der Glyoxysomen auch in den Peroxisomen vor. Scandalios (1974) interpretiert das zeitliche Auftreten verschiedener Isoenzyme, als Konsequenz differentieller Genaktivitäten. Deshalb sind Isoenzyme,

unabhänig von der Regulation, ein Ausdruck des Differenzierungszustands eines Gewebes.

2.: Isoenzyme lassen sich unabhängig vom Alter und Differenzierungszustand eines Gewebes jederzeit nachweisen. Das gilt insbesondere für kompartimentspezifische Isoenzyme der Chloroplasten und Mitochondrien.

Beispiele für kompartimentspezifische Isoenzyme sind von den Arbeitsgruppen um Anderson und Schnarrenberger beschrieben worden. Sie beschäftigten sich besonders mit Isoenzymen des Zuckerphosphat-Stoffwechsels, der auf die beiden Kompartimente Cytoplasma und Plastiden verteilt ist.
Glykolyse und Glukoneogenese beinhalten reversible enzymatische Reaktionen und werden im Cytoplasma katalysiert. Der oxidative Pentosephosphatzyklus findet sowohl im Cytoplasma als auch in den Chloroplasten statt. Die Enzyme des Calvin-Zyklus sind nur in den Chloroplasten lokalisiert. Das Auftreten isofunktioneller Enzyme ist somit nicht überraschend. Beschrieben wurden u.a. Isoenzyme der Glucose-6-Phosphat Isomerase (Schnarrenberger und Oeser, 1974), Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (Schnarrenberger et al., 1973, 1975), Fructose-bisphosphat-Aldolase (Anderson und Pacold, 1972), Phosphoglycerat-Kinase (Pacold und Anderson, 1975; Anderson et. al., 1975) und Ribose-5-Phosphat-Isomerase (Anderson, 1971 b).

Die physiologische Bedeutung der Isoenzyme liegt nicht nur in der Katalyse gleicher Reaktionen in einem oder mehreren Kompartimenten, wie dieses für die Enzymformen des Zuckerphosphat-Stoffwechsels dargestellt wurde, sondern auch in einer regulatorischen Funktion bei ver-

zweigten Stoffwechselwegen.

Stadtman et al. (1961) untersuchten die Biosynthesen der Aminosäuren Methionin, Lysin und Threonin in Escherichia coli, die von drei Enzymformen der Aspartokinase geregelt werden. Von Aspartat ausgehend wird über Aspartylphosphat die Biosynthesekette verzweigt, die in der Bildung der drei Aminosäuren endet. Die Isoenzyme werden durch ihr eigenes Produkt gehemmt ("Feedback"-Hemmung), sie werden kontrolliert und kontrollieren ihrerseits den Stoffwechselweg.

In dieser Arbeit soll speziell auf die Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase eingegangen werden. Es sind kompartimentspezifische Isoenzyme, die im Cytoplasma und den Chloroplasten lokalisiert sind. Bislang sind wenige Untersuchungen an diesen Proteinen aus Pflanzen durchgeführt worden. Das untersuchte Gewebe sind die Primärblätter aus Roggenkeimlingen.

Die Triosephosphat Isomerase (D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Ketol Isomerase, EC 5.3.1.1) katalysiert reversibel die Isomerisierung von Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat. Das Enzym ist in allen tierischen und pflanzlichen Organismen verbreitet (vgl. Tab.2 aus Snapka et al., 1974; Tab.1 aus Gracy, 1975; Tab.1 aus Bukowiecki und Anderson, 1975). Die Triosephosphat Isomerase wurde 1935 von Meyerhof und Kiessling zum erstenmal aus tierischen Geweben isoliert und charakterisiert. In den darauffolgenden Jahren wurde sie kristallisiert (siehe Review: Noltmann, 1972). Für die Enzyme aus Kaninchenmuskel (Corran und Waley, 1973, 1975) und Bacillus stearothermophilus (Artavanis-Tsakonas und Harris, 1980) wurden die Aminosäuresequenzen aufgeklärt.

Turner et al. wiesen 1965 Triosephosphat Isomerase-Aktivität in Extrakten aus Bohnen-, Weizen- und Maissamen, aus Sproß- und Wurzelgeweben von Erbsen-, Bohnen-, Weizen- und Maiskeimlingen und aus reifen Blättern der Erbse nach. Tomlinsen und Turner (1979) untersuchten Stoffwechselmetabolite als mögliche Regulationsfaktoren für die Aktivität der Triosephosphat Isomerase in Rohextrakten. Die Autoren charakterisierten jedoch nicht strukturelle Eigenschaften des gereinigten Enzymproteins aus Erbsensamen.

In niederen Tieren und Mikroorganismen konnte nur eine einzige Form der Triosephosphat Isomerase beobachtet werden. Hingegen liegen in allen untersuchten Geweben von Wirbeltieren zwei oder mehr multiple Formen vor. Für pflanzliche Gewebe sind zwei Formen bekannt geworden. Das Auftreten isofunktioneller Formen der Triosephosphat Isomerase in tierischen Geweben ist nicht Organell-gebunden und somit nicht genau geklärt. Unbestimmt ist, ob unterschiedliche Regulationseigenschaften vorliegen, da die Reaktionen der Glykolyse, der Glukoneogenese und des oxidativen Pentosephosphat Zyklus, die von den Isoenzymformen der Triosephosphat Isomerase katalysiert werden, alle im Cytoplasma stattfinden. Die Bedeutung der Isoenzymformen in Pflanzen ist klarer und übersichtlicher. Sie sind kompartimentiert und katalysieren einerseits die gleichen Reaktionen im Cytoplasma-(cytoplasmatische Form), wie die tierischen Formen, während die plastidäre Form an Reaktionen des Calvinzyklus und des oxidativen Pentosephosphat Zyklus beteiligt ist.

Anderson und Advani (1970) beschrieben zuerst Eigenschaften von Isoenzymen der Triosephosphat Isomerase aus pflanzlichen Geweben. Die Charakterisierungen wurden mit Fraktionen nach isoelektrischer Fokussierung durchge-

führt. Anderson (1971a) stellte fest, daß sich die Isoenzyme in katalytischen Eigenschaften kaum unterscheiden. Die pH-Optima, Michaelis-Konstanten und Inhibitorkonstanten waren für beide Formen recht ähnlich. Sie glaubte aber, daß die cytoplasmatischen und plastidären Formen der Triosephosphat Isomerase verschiedene Proteine sind, da sie aufgrund unterschiedlicher Ladung trennbar waren.
Ähnliche Ergebnisse erzielten Mo et al. (1973) bei der Untersuchung der Triosephosphat Isomerase aus dem Protophyten Euglena gracilis. Auch sie konnten die cytoplasmatische und plastidäre Form der Isomerase durch isoelektrische Fokussierung trennen und beschrieben die Isoenzyme in bezug auf katalytische Eigenschaften als kaum unterscheidbare Proteine. Mo et al. wiesen auch die Biosyntheseorte der Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase nach. Sie stellten fest, daß durch Cycloheximid, einen Translationshemmer der 80s Ribosomen, die Synthese des cytoplasmatischen Isoenzyms unterbunden wird, während in Gegenwart von Chloramphenicol, das die 70s Ribosomen der Plastiden hemmt, kein plastidäres Isoenzym gebildet wurde.

Zur Bestimmung des Syntheseortes eignet sich ein von Feierabend et al. (1969) entwickeltes System besonders, da es ohne Hemmstoffe die Proteinbiosynthese von Chloroplasten verhindert. Durch erhöhte Wachstumstemperaturen ($32^{o}C$) wird ganz spezifisch die Bildung der plastidären 70s Ribosomen unterdrückt. Ein sehr gut untersuchtes System sind die Primärblätter des Roggen. Die Temperatur bedingt chlorotische Blätter, wodurch der physiologische Zustand in den ersten sechs Tagen nach der Keimung - mit Ausnahme der Proteinbiosynthese in den Plastiden - nicht negativ beeinflußt wird. Die Organellen in den chlorotischen Teilen der Blätter enthalten die c-DNA, die, wie Analysen durch Restriktionsendonukleasen

zeigen, völlig normal ist (Herrmann und Feierabend, 1980) und die RNA-Polymerase, die selbst bei 32°C noch aktiv nachgewiesen werden kann (Bünger und Feierabend, 1980). Das Proteinbiosynthesesystem des Cytoplasmas ist durch die höhere Temperatur nicht geschädigt, und das Erscheinungsbild der Organellen im EM und die Enzymausstattung der Mitochondrien und Peroxisomen ist normal im Vergleich zu den bei 22°C gewachsenen Pflanzen (Feierabend und Schrader-Reichhardt, 1976; Schäfers und Feierabend, 1976). Das System bietet sich als geeignete Methode an, Chloroplastenproteine, die an 80s Ribosomen synthetisiert wurden, zu identifizieren.

Der Syntheseort der Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase aus höheren Pflanzen wurde zuerst von Riese (1976) und von Feierabend (1979) beschrieben. Sie konnten durch Säulenchromatographie von Blattextrakten zwei Fraktionen mit Triosephosphat Isomerase-Aktivität trennen und somit nachweisen, daß Pflanzen, die bei erhöhter, nicht-permissiver Temperatur aufgezogen wurden, beide Isoenzyme der TIM an cytoplasmatischen 80s Ribosomen synthetisieren.

Da die plastidäre Form der Triosephosphat Isomerase nicht in den Plastiden selbst, sondern im Cytoplasma synthetisiert wird, ist ein Transport des Proteins durch die Organellmembranen notwendig. Um diesen selektiven Transport zu ermöglichen, muß das plastidäre Isoenzym in struktureller Hinsicht soweit genetisch oder epigenetisch verändert sein, daß es transportfähig wird. Könnten beide Isoenzyme nach ihrer Synthese die Membranen passieren, müßte die cytoplasmatische Form modifiziert werden, um einen Transport zu verhindern. Über die Biogenesestadien der Isoenzyme und über den spezifischen Transportmechanismus von Enzymformen in andere Organellen ist nichts Näheres bekannt.

Bislang werden zwei Mechanismen für den intrazellulären Transfer von Proteinen postuliert. Für Proteine, die die Mikrosomenmembranen passieren, wird ein co-translationaler Transport angenommen, während für mitochondriale und plastidäre Proteine ein post-translationaler Transfer postuliert wird. (Blobel und Dobberstein, 1975; Ellis et al., 1979; Kreil, 1981). Die Hypothesen beruhen auf cytoplasmatisch synthetisierten Präkursorproteinen. Die "zusätzlichen" Aminosäuren sollen als "Signal" für die Erkennung von Membranbereichen fungieren, durch die die Proteine transferiert werden. Die "Signalsequenz" hat sehr oft einen hydrophoben Charakter, der einen Kontakt mit den Lipiden der Membran ermöglicht. Das von DiRienzo et al. (1978) postulierte "Schleifenmodell" basiert ebenfalls auf eine Peptid-Phospholipid-Wechselwirkung des "Signalpeptids" mit der Membran.
Auffällig ist, daß viele "sekretierte" Proteine glykosyliert sind. Wenn man den Transport cytoplasmatisch synthetisierter Proteine in die Plastiden ebenfalls als "Sekretion" bezeichnen würde, wäre es gut möglich, daß auch das plastidäre Isoenzym der Triosephosphat Isomerase glykosyliert ist, wie es für die Hefe-Enzyme Invertase, saure und alkalische Phosphatase und Carboxypeptidase Y beschrieben wurde (Onishi et al., 1979), die einerseits in den extrazellulären Raum an die Außenseite der Zellwand , andererseits in die Vakuolen sezerniert werden. Streitfragen in der gegenwärtigen Literatur sind der Zeitpunkt der Glykosylierung und die Funktion des Kohlenhydratanteils beim Transport. Es ist nicht sicher, daß die Proteine während oder bei der Translation glykosyliert werden, und ob die Glykosylierung vor oder nach dem Transport durch die Membran stattfindet.

Voraussetzungen, aufgrund molekularer Unterschiede die Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase zu charakte-

risieren, sind im Hinblick auf physikochemische und kinetische Parameter bereits von Kurzok (1977) beschrieben worden. Nachdem ein Verfahren zur Reinigung der beiden Enzymformen erarbeitet war, konnten erste Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede bestimmt werden.
Es konnte gezeigt werden, daß die Isoenzyme säulenchromatographisch trennbar waren und sich somit in ihren Gesamtladungen unterschieden. Die Isoenzyme waren bei verschiedenen pH-Werten optimal aktiv. Das plastidäre Isoenzym war gegenüber Hitzedenaturierung stabiler als die cytoplasmatische Form. Gemeinsamkeiten wurden durch erste Molekulargewichtsbestimmungen, Messungen der Michaeliskonstanten und Inhibitorkonstanten festgestellt. Die Ergebnisse ließen die Aussage zu, daß die Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase aus verschiedenen Polypeptidketten aufgebaut waren.

Im Rahmen dieser Arbeit soll festgestellt werden, ob sich 1.) definierte Unterschiede in den Primärstrukturen der cytoplasmatischen und plastidären Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase aus Blattextrakten von Roggenkeimlingen nachweisen lassen. Es soll untersucht werden, ob die Unterschiede genetischen Ursprungs sind und ob zusätzlich epigenetische Veränderungen vorhanden sind. Um größere Quantitäten gereinigter Enzymproteine zu erhalten, ist es
2.) erforderlich, das in der Diplomarbeit beschriebene Reinigungsverfahren (Kurzok, 1977) zu verbessern.

3. Wenn genetisch bedingte Unterschiede die Ursache der Verschiedenheit der Proteine sind, soll der zeitliche Verlauf der Biogenese der getrennten Isoenzyme verfolgt werden. Mit spezifischen, gegen die cytoplasmatische und plastidäre Form der TIM gerichteter Antikörpern soll qualitativ die Entwicklung jedes der beiden Isoenzyme dargestellt werden. Die Biogenese der Isoenzyme soll

nach verschiedenen Anzuchtsbedingungen der Pflanzen, die in Licht bzw. Dunkelheit, und bei 22°C bzw. 32°C angezogen werden, untersucht werden und es soll festgestellt werden, in wieweit die Synthese der Isoenzyme getrennt reguliert werden kann.

4.) Die Triosephosphat Isomerase ist ein in allen Organismen beschriebenes Enzym. Mit den spezifischen Antikörpern gegen die Isoenzyme der TIM aus Roggen sollen strukturelle Ähnlichkeiten zwischen den Enzymformen aus Roggen und TIM-Formen anderer pflanzlicher, tierischer und mikrobieller Organismen aufgezeigt werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. PFLANZENMATERIAL UND ANZUCHTBEDINGUNGEN

Als Versuchsmaterial diente ungebeizter Petkuser Winterroggen (Petkus Kustro) aus den Ernten 1978-1980. Das Saatgut wurde bei 25°C im Dunkeln gelagert. Zur Oberflächensterilisierung wurden die Karyopsen vor der Anzucht in einer frisch angesetzten Ca-Hypochlorit-Lösung (3%) 10 Minuten im Exsikkator evakuiert. Nach 30-minütiger Infiltration wurde der Chlorkalkrückstand durch mehrmaliges Waschen in entionisiertem Wasser entfernt (2h).

Für präparative Verfahren wurden die eingequollenen Karyopsen auf Vermiculite Nr. 3 in Plastikschalen der Größe 60 x 40 x 5 cm ausgesät und mit einer dünnen Schicht Vermiculite bedeckt. Die Keimlinge wurden täglich mit 800 ml Knop'scher Nährlösung (s.u.) pro Schale gegossen.
Für qualitative und quantitative Untersuchungen wurden die Samen im Dunkelraum bei dunkelgrünem Sicherheitslicht auf Filterpapier (Schleicher & Schüll, Nr. 598) in Plastikschalen der Größe 20 x 10 x 10 cm mit dem Embryo nach oben ausgelegt. Die Plastikschalen wurden mit einer Glasscheibe bedeckt. Pro Schale wurde täglich mit 20 ml Aqua bidest gegossen, und die vom Vortag verbliebene Flüssigkeit wurde verworfen.

Die Keimlinge wurden unter verschiedenen Bedingungen angezogen:
a) bei 22°C und b) bei 32°C im Dauerlicht. c) bei 22°C in Dunkelheit, wobei die Plastikschalen zusätzlich in zwei Licht-undurchlässigen Leinensäckchen eingepackt wurden. Die Keimlinge wurden in Klimaschränken gehalten. Als Lichtquellen dienten je sechs in alternierender

Folge angeordnete Leuchtstoffröhren der Firma Astra 40 W P SG und Warmton de Luxe 40 W D 4T. Die Lichtintensität betrug 5000 ± 500 Lux.

Für immunologische Vergleiche wurden außer Roggen zusätzlich Weizen, Hafer, Gerste und Erbsen wie oben beschrieben angezogen und am siebten Tag, Erbsen am 10. Tag, geerntet. Es wurden Blatt- und Wurzelgewebe gewonnen.
Mais (8 Wochen alt), Tabak (3 Monate), Catharanthus, Baumwolle (4 Wochen) wurden von Dr. G. Wildner zur Verfügung gestellt. Ein Rohextrakt von Escherichia coli K 12 λ wurde von Dipl. Biol. L. Wieczorek überlassen. Für Triosephosphat Isomerase aus Kaninchenmuskel und Hefe wurden käuflich gereinigte Enzyme verwendet.

Nährlösung nach Knop modifiziert nach Feierabend-Schrader-Reichhardt (1976):

Stammlösungen:

$CA(NO_3)_2$	26,8 g / 500 ml
KNO_3	71,5 g / 500 ml
KH_2PO_4	7,2 g / 500 ml
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	14,3 g / 500 ml
KCl	7,1 g / 500 ml
Fe-Komplex	695 mg $FeSO_4 \times 7\ H_2O$ + 930 mg NA_2-EDTA (Titriplex III) wurden in 80 ml Aqua bidest aufgekocht, abgekühlt und auf 100 ml mit Aqua bidest aufgefüllt.

Spurenelemente ad 1000 ml:

$MnSO_4 \times H_2O$	4500 mg
$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	1500 mg
$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	40 mg
$Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$	500 mg
H_3BO_4	1500 mg.

Die Nährlösung setzte sich zusammen aus je 10 ml Stammlösung für $Ca(NO_3)_2$, KNO_3, KH_2PO_4, $MgSO_4$, aus 5 ml KCl und je 1 ml Fe-Komplex und Spurenelementen und wurde ad 1000 ml mit Aqua bidest aufgefüllt.

2. HERSTELLEN ZELLFREIER EXTRAKTE

Die Präparationen wurden in der Kälte bei 4°C durchgeführt. Sämtliche Hilfsmittel wie Mull, Miracloth, Trichter, Gefäße, Zentrifugenbecher, Puffer, Mixgeräte wurden vorgekühlt.
Als Homogenisierungspuffer wurde 300 mM Saccharose - 10 mM Natriumphosphat-Puffer - 20 mM Mercaptoäthanol - 0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, pH 8,0 verwendet.
Am siebten Anzuchtstag wurden die Primärblätter des Roggens geerntet, grob zerkleinert, gewogen und mit 2 ml Homogenisierungspuffer pro Gramm Frischgewicht in einem Waring Blendor 6 x 30 s aufgeschlossen. Das Rohhomogenat wurde über vier Lagen Mull und zwei Lagen Miracloth filtriert. Der Extrakt wurde mit 5 N KOH auf pH 8 eingestellt. Pro 1 Gramm Frischgewicht wurden 100 mg nicht-lösliches Polyvinylpyrrolidonpulver (Polyclar AT, Hedinger) (Schneider und Hallier, 1970) in den Extrakt eingerührt und für 60 Minuten darin belassen. Das PVP wurde über zwei Lagen Mull abfiltriert und die Suspension 60 Minuten bei 13 000 x g zentrifugiert (GS3-Rotor, Sorvall Superspeed RC-2B). Der klare Überstand wurde als Rohextrakt bezeichnet.

3. REINIGUNGS- UND TRENNVERFAHREN

3.1 Ammoniumsulfatfällungen

Die Ammoniumsulfatfällungen wurden in drei Schritten

nach der Tabelle von Green und Hughes (1955) bei 4°C im Eisbad durchgeführt.

1. Der klare Überstand wurde kontinuierlich unter Rühren mit festem, fein pulverisiertem Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 25% Sättigung versetzt. Dabei wurde der pH-Wert mit 5 N KOH auf 8 gehalten und 30 Minuten nachgerührt. Der Niederschlag wurde bei 13 000 x g im GS3-Rotor auf der Sorvall Superspeed RC-2B Zentrifuge bei 4°C für 45 Minuten abzentrifugiert und verworfen.
2. Der klare Überstand wurde mit Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 40% versetzt. Nach dreißigminütigem Nachrühren wurde der Niederschlag wie oben beschrieben abzentrifugiert und verworfen.
3. Im dritten Fällungsschritt wurde Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 80% hinzugefügt. Nach dreißigminütigem Nachrühren und 45 Minuten Zentrifugation bei 13 000 x g wurde das Sediment in 25 mM Kaliumphosphat-Puffer - 20 mM MET - 0,5 mM PMSF, pH 8,6 resuspendiert und mit dem gleichen Puffer auf 500 - 550 mS (= 18 - 21% Ammoniumsulfat-Endkonzentration) verdünnt.

3.2 Säurefällungen

Die Enzymsuspension wurde in einem Becherglas in Eis unter Rühren innerhalb von 5 Minuten durch tropfenweise Zugabe einer 1 M Lösung KH_2PO_4 x H_3PO_4, pH 3 auf pH 4,7 gebracht. Nach weiteren 5 Minuten wurde der Niederschlag bei 48 000 x g (SS34, Sorvall Superspeed RC-2B) bei 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert und verworfen. Der klare Extrakt wurde mit 1 N KOH auf pH 8,6 eingestellt. Der Vorgang wurde einmal wiederholt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der klare Überstand mit 1 N KOH auf pH 8,6 eingestellt und für 10 Stunden gegen 5 Liter 12,5 mM Kaliumphosphat-Puffer-20 mM MET - 0,5 mM PMSF, pH 8,6

dialysiert. Nach einmaligem Wechseln und Erhöhen der Molarität des Puffers auf 25 mM wurde nach weiteren 10 Stunden die Enzymlösung klarzentrifugiert und zur weiteren Reinigung auf eine DEAE-Sepharose CL-6B-Säule in 25 mM Kaliumphosphat-Puffer - 20 mM MET - 0,5 mM PMSF, pH 8,6, geschichtet.

3.3 Anionenaustauscherchromatographie

DEAE-Sepharose CL-6B (Pharmacia Fine Chemicals) wurde vor Gebrauch mehrmals mit 25 mM Kaliumphosphat-Puffer - 20 mM MET - 0,5 mM PMSF, pH 8,6 gewaschen. Das Gel wurde in die Säule gefüllt und mit dem gleichen Puffer solange nachgewaschen, bis die Leitfähigkeit und der pH-Wert des Eluates den Werten des Ausgangspuffers entsprachen. Die Säulengröße betrug 2,5 x 15 cm, das Gelbettvolumen 75 cm^3. Das klarzentrifugierte Dialysat wurde vorsichtig auf die Gelmatrix geschichtet. Nach dem Einlaufen des Extraktes wurde solange gewaschen, bis die Extinktion bei 280 nm kleiner als 0,15 war. Eluiert wurden die Proteine mit einem kontinuierlich (linear) ansteigenden Phosphat-Gradienten von je 1000 ml 25 mM Kaliumphosphat-Puffer - 20 mM MET - 0,5 mM PMSF, pH 8,6 und 200 mM Kaliumphosphat-Puffer - 20 mM MET - 0,5 mM PMSF, pH 8,6. Die Fraktionsgröße betrug 130 Tropfen = 10 ml. Die Fraktionen der jeweiligen Isoenzyme (Cyto-TIM = cytoplasmatisches Isoenzym; Cp-TIM = plastidäres Isoenzym) mit einer Mindestaktivität von 50 nkat x ml^{-1} wurden vereint, mit 80% Ammoniumsulfat (Endkonzentration) ausgefällt und bei 48 000 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Die Sedimente wurden möglichst konzentriert in Phosphat-Puffer, pH 8,6 resuspendiert. Nachdem die in Puffer aufgenommenen Enzymlösungen klarzentrifugiert waren, wurden sie auf Ultrogel AcA 44 geschichtet (s.u.).

DEAE-Cellulose SS 23 (Serva) wurde für quantitative Vergleiche der multiplen Formen der Triosephosphat Isomerase eingesetzt. Je drei gleich-dimensionierte Säulen mit 5 ml Gelbettvolumen wurden mit der vorbehandelten Gelmatrix (vgl. oben) gefüllt und äquilibiert. Je 1 Gramm Pflanzenmaterial der unter verschiedenen Bedingungen angezogenen sechs Tage alten Roggenkeimlinge (vgl. II.1) wurde wie oben (II.2) aufgeschlossen. Von den bei 32°C und Dauerlicht gezogenen Pflanzen wurden nur die unteren Hälften (chlorotische Teile) der Primärblätter verwendet. Die klarzentrifugierten Rohextrakte wurden auf die Säulen geschichtet und mit dem Puffer solange gewachen, bis die Extinktion bei 280 nm kleiner als 0,15 war. Die Proteine wurden mit einem kontinuierlich steigenden Gradienten von je 50 ml 25 mM Phosphatpuffer pH 8,6 und 250 mM KCl in dem gleichen Puffer eluiert.

3.4 Gelfiltration

Ultrogel AcA 44 (LKB Produkter, Schweden) wurde über eine Fritte mehrmals mit 25 mM Kaliumphosphat-Puffer - 200 mM KCl - 20 mM MET - 0,5 mM PMSF pH 8,6 gewaschen und entgast, bevor es in die Säule (3,2 x 180 cm) gegossen wurde. Vor dem ersten Gebrauch wurde die Säule drei Tage im Kühlraum bei 4°C mit dem gleichen Puffer äquilibriert. Die Ammoniumsulfat-haltigen, klarzentrifugierten Proben der Cyto-TIM und Cp-TIM wurden auf den auf dem Gel liegenden Probenadapter geschichtet und mit dem Phosphatpuffer (s.o.) eluiert (maximales Probenvolumen 1% des Gelbettvolumens). Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 70 ml/h. Fraktionen von 10 ml wurden gesammelt. Fraktionen mit Triosephosphat Isomerase-Aktivität größer als 50 nkat x ml^{-1} wurden vereint und mit Ammoniumsulfat bei einer Endkonzentration von 80% gefällt.

Von diesen Proben wurden die Aktivität und der Proteingehalt bestimmt. Die Enzymlösungen wurden direkt auf Sepharose 4B (Pharmacia) in 80% Ammoniumsulfat-haltigen Phosphatpuffer s.o. geschichtet.

Zur Molekulargewichtsbestimmung nach Andrews (1965) und Gibson und Tabita (1977) wurden Sephadex G-100 oder G-200 (Pharmacia) bzw. Ultrogel AcA 44 (LKB) verwendet. Die Sephadex-Gele wurden in 25 mM Kaliumphosphat-Puffer - 20 mM MET - 0,5 mM PMSF pH 7,5 vorgequollen, wobei zusätzlich 0,15 M Ammoniumsulfat (G-200) bzw. 0,15 M KCl (G-100) in dem Puffer gelöst wurden. Ultrogel AcA 44 wurde in dem gleichen Puffer, jedoch mit pH 8,6 und ohne KCl bzw. Ammoniumsulfat voräquilibriert. Die Säulengrößen betrugen jeweils 2 x 100 cm. Es wurden Fraktionen mit 2,7 ml gesammelt. Die Molekulargewichte wurden durch Erstellen einer Eichgeraden mit Proteinen aus der Combithek, Größe II von Boehringer berechnet. Verwendet wurden 0,5 mg Ferritin (450 KD) als Indikatorprotein des Leervolumens sowie 5 mg Rinderserumalbumin (67 KD), 3 mg Ovalbumin (45 KD) und 5 mg Cytochrom C (12,5 KD) als Eichproteine. Die Eichgerade wurde semilogarithmisch dargestellt.

3.5 "Salting-Out" -Chromatographie

Sepharose 4B (Pharmacia) wurde in 25 mM Kaliumphosphat-Puffer - 20 mM MET - 6 M $(NH_4)_2SO_4$ - 0,5 mM PMSF pH 7,2 vorgequollen, entgast und in die Säule (2,5 x 15 cm) gegossen. Die Enzymlösung wurde auf das Gel geschichtet und mit dem gleichen Puffer nachgewaschen. Durch einen kontinuierlich absteigenden Ammoniumsulfat-Gradienten von je 600 ml 80% und 10% Ammoniumsulfat in Phosphat-Puffer pH 7,2 wurden die Proteine eluiert (von der Haar, 1976). Die Fraktionen mit Triosephosphat Isomerase-Akti-

vität wurden vereint und mit fein pulverisiertem Ammoniumsulfat auf 850 mS = 80% Ammoniumsulfat eingestellt. Durch hochtouriges Zentrifugieren wurde der Niederschlag sedimentiert, in wenig 50 mM Tris-HCl- Puffer - 20 mM MET pH 7,5 resuspendiert, getestet und 12 Stunden gegen 5 Liter des gleichen Puffers dialysiert. Die entsalzte Enzymlösung wurde klarzentrifugiert und in einem Dialyseschlauch (Visking, Serva, Ausschlußgröße 20 KD), der mit trockenem Ficoll 400 (Pharmacia) bedeckt wurde, durch Wasserentzug auf 2-3 ml konzentriert. Das Konzentrat wurde nochmals gegen den gleichen Puffer dialysiert, um das konzentrierte Protein von der Wand des Schlauches zu lösen und die dem Originalpuffer entsprechende Molarität herzustellen. Die Proben Cyto-TIM und Cp-TIM wurden für die Polyacrylamidgelelektrophorese vorbereitet (s.u.).

3.6 Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Elektrophoresen wurden nach Laemmli (1970) verändert für Flachgele durchgeführt. Für präparative Zwecke wurde eine 20 cm lange, 13 cm breite und 1,5 mm tiefe Kammer verwendet. Die Trennstrecke betrug 16 cm. Für analytische Untersuchungen wurde eine 10 x 13 x 0,15 cm Kammer eingesetzt. Als Spannungsquelle diente ein Pulsed Constant Power Supply von Ortec (Modell 4100).

Stammlösungen in H_2O-bidest:

A 30% Acrylamid mit 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid
B 1,5 M Tris-HCl pH 8,8
C 0,5 M Tris-HCl pH 6,8
D 20% Natriumdodecylsulfat
E 10% Ammoniumperoxodisulfat
F unverdünntes N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin

3.6.1 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Für Gradientengele unter denaturierenden Bedingungen wurden die Lösungen in einer Mischkammer in folgender Zusammensetzung gemischt:

10%	15%	20%
2,50 ml A	3,75 ml A	5,00 ml A
2,50 ml B	2,50 ml B	2,50 ml B
2,33 ml H_2O	1,10 ml H_2O	0,00 ml H_2O
0,15 ml D	0,15 ml D	0,15 ml D
0,015 ml E	0,015 ml E	0,015 ml E
0,015 ml F	0,015 ml F	0,015 ml F

Nach Überschichten mit H_2O bidest polymerisierte das Gel in 30 Minuten bei Raumtemperatur.

Für ein 6% Sammelgel wurden folgende Lösungen verwendet:

2,00 ml A
2,50 ml C
5,35 ml H_2O
0,20 ml D
0,01 ml E
0,01 ml F

Das Gel polymerisierte etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur. Als Elektrodenpuffer wurde 50 mM Tris - 384 mM Glycin pH 8,3 + 0,1% Natriumdodecylsulfat verwendet.

Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Bei einer Laufzeit von 15 Stunden betrugen die Spannung ca. 50 V und die Stromstärke exakt 10 mA bei 300 Pulsen pro Sekunde und einer Kapazität von 0,1 µ Farad.

Die Extrakte wurden zur Denaturierung mit dem Probenpuffer (s.u.) nach Cleveland et al. (1977) im Verhältnis 1 : 1 verdünnt, für 2 Minuten im Wasserbad gekocht und nach dem Abkühlen auf das Gel aufgetragen.

Probenpuffer:
0,90 ml 250 mM Tris-HCl pH 6,8 - 20% Glycerin - 0,002% Bromphenolblau
0,05 ml 20% Natriumdodecylsulfat
0,05 ml Mercaptoäthanol

Als Markerproteine für die denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese wurden für den Molekulargewichtsbereich zwischen 10 und 100 KD der "Low Molecular Weight Calibration Kit" (Pharmacia) verwendet. Die lyophilisierten Proteine wurden mit 500 µl Elektrodenpuffer + 2,5% SDS + 5% Mercaptoäthanol (Pharmacia-Vorschrift) versetzt und 15 Minuten im Wasserbad gekocht. Die Zusammensetzung der Markerproteine zeigt Tabelle 1:

Tabelle 1:

Protein	Herkunft	Molekulargewicht
Phosphorylase b	Kaninchen	94 000
Albumin	Rind	67 000
Eialbumin	Eiweiß	43 000
Carbo-Anhydrase	Rinderery-throzyten	30 000
Trypsin-Inhibitor	Sojabohne	20 100
α-Lactalbumin	Kuhmilch	14 400

3.6.2 Nicht-denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Für Gele unter nicht-denaturierenden Bedingungen wurden die Stammlösungen A, B, C, E und F und der gleiche Elektrodenpuffer ohne Natriumdodecylsulfat verwendet. Gut dialysierte Proteine wurden über Nacht im Kühlraum in einem 10% Gel bei 4°C mit 80 V bzw. 10 mA aufgetrennt. Für den Nachweis der Isoenzyme durch eine Aktivitätsfärbung im Gel nach Scopes (1968) wurde ein 7,5% Gel verwendet.

3.7 Darstellung der Proteine und Peptide nach Polyacrylamidgelelektrophorese

3.7.1 Färbung mit Coomassie Brilliant Blue G-250

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine im Gel mit 12,5% Trichloressigsäure (TCA) fixiert (30 Minuten) und das Gel anschließend für 30 Minuten in 10% Essigsäure belassen. Nach Färbung der Proteine in einem Färbegemisch aus 1,25 g Coomassie Brilliant Blue G-250 - 454 ml 50% Methanol - 46 ml Eisessig (Weber und Osborn, 1969) wurde das homogen blau gefärbte Gel mit H_2O bidest gewaschen und für 2 Stunden in Entfärbelösung entfärbt (Zusammensetzung: 75 ml Eisessig - 50 ml Methanol - 875 ml H_2O-bidest). Bis zur völligen Klarheit der nicht-Proteinhaltigen Gelbereiche wurde das Gel in 10% Essigsäure gelagert.

3.7.2 Schnellfärbemethode

Die Färbemethode wurde nach Vesterberg (1977) durchgeführt. Nach Beendigung der präparativen Elektrophorese

wurden zwei Streifen aus dem Gel geschnitten und in 14,7 g TCA + 44 g Sulfosalicylsäure + 910 ml H_2O bidest für 10 Minuten bei 60°C im Wasserbad inkubiert. Sofort anschließend wurde die Färbelösung, die aus 0,4 g Coomassie Brilliant Blue G-250 + 30 ml 70% Perchlorsäure + 970 ml H_2O bidest bestand, über das Gel gegossen, 10 Minuten gefärbt und danach mehrmals mit H_2O bidest gewaschen. Der Gelstreifen wurde wieder in das ursprüngliche Gel eingepaßt. Parallel zu den gefärbten Proteinbanden wurde eine Glasscheibe auf das Gel gelegt und mit einer Rasierklinge die zwischen den Streifen liegenden, nicht gefärbten Gelbereiche herausgeschnitten. Das Gel wurde durch eine Kanüle in ein Reagenzglas gepreßt, mit 50 mM Tris-HCl-Puffer - 20 mM MET, pH 7,5 überschichtet und bei 4°C im Kühlraum gelagert. Nach Diffusion des Proteins aus dem Gel wurde das Gel sedimentiert und der Überstand mit einer Pasteurpipette abgehoben. Danach wurde das Gel erneut mit Puffer überschichtet und der Vorgang bis zur quantitativen Extraktion mehrere Male wiederholt. Da diese Methode keine vollständige Ausbeute garantiert, wurde das zerkleinerte Gel schließlich elektrophoretisch in einem ISCO electrophoretic sample concentrator Modell 1750 (Allington et al., 1978) bei 1 Watt Leistung (10 mA bei 100 V) für 4 - 6 Stundenim Eisbad eluiert. Die Proteinlösung wurde mit den anderen Proben vereint und über Ficoll 400 durch Wasserentzug eingeengt. Die konzentrierten Proben wurden nach Zugabe von Ammoniumsulfat (20% Endkonzentration) bei 4°C gelagert.

3.7.3 Darstellung mit 1 M KCl

Wenn die Proteine nach SDS-Gelelektrophorese weiter verwendet werden sollten, z.B. für partielle Hydrolysen, und ihre Fähigkeit im elektrischen Feld zu wandern nicht

durch TCA-Fällung verlieren sollten, wurde das Gel für 5 Minuten in eine 1 M KCl-Lösung (Hager und Burgess, 1980) gelegt. Das an den Proteinen anhaftende Dodecylsulfat fiel als Kaliumsalz aus. Mit einer Rasierklinge wurden die weißen Präzipitate als Kaliumdodecylsulfat-Protein-Komplexen aus dem Gel herausgeschnitten, in einem Dialyseschlauch 60 Minuten gegen H_2O bidest und 50 mM Tris-HCl pH 6,8 dialysiert und entweder sofort weiterverwendet oder bei -20°C gelagert.

3.7.4 Aktivitätsfärbung der Triosephosphat Isomerase

Nach der Elektrophorese wurde das Gel in eine mit N_2-begaste, frisch zubereitete Färbelösung nach Scopes (1968) gelegt und dort solange belassen, bis die violetten Banden gut sichtbar waren. In 20 ml 50 mM Tris-HCl pH 7,5 wurden

50,0 mg Nitroblautetrazoliumsalz (NBT)
8,6 mg Phenanzin-Metosulfat (PMS)
20,0 mg Nicotinamidadenindinukleotid oxidiert (NAD^+)
50,0 mg Natriumarsenat
6,8 mg Dihydroxyacetonphosphat (DAP, Sigma)
3,2 ml ≙ 2,6 µkat Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

gelöst. Nach dem Erscheinen der Banden wurde das Gel mit H_2O bidest gewaschen und photographiert.

3.7.5 Aufzeichnung der Absorptionsprofile

a) Von gereinigten, homogenen Proben der Cyto-TIM und Cp-TIM wurden nach Elektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen in einem 10% Gel Absorptionsprofile bei 540 nm nach Coomassiefärbung aufgenommen. Die Extinktion des Gels wurde automatisch in einer "Scan"-Ein-

richtung am Gilford Spektralphotometer 240 A gemessen und aufgezeichnet.

b) Zur Darstellung Bromcyan-gespaltener Isoenzymproteine wurde ein Absorptionsprofil eines Photonegativs mit einer "Film Scanning Adapter"-Einrichtung bei 550 nm (0,5 cm/min bei einer Schreibergeschwindigkeit von 1cm/-min) aufgezeichnet.

3.7.6 Nachweis von Glykoproteinen

Nach elektrophoretischer Auftrennung reiner Proteine der Triosephosphat Isomerase-Isoenzyme durch native und denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese wurden Glykoproteinbestimmungen durchgeführt.

3.7.6.1 Perjodsäure-Schiff-Färbung

1.) Die Bestimmung wurde nach Zacharius et al. (1969) durchgeführt. Das Gel wurde für 30 Minuten in 12.5% TCA gelegt und anschließend mehrmals mit H_2O bidest gewaschen. Die Proteine wurden 50 Minuten durch 1% Perjodsäure in 3% Essigsäure oxidiert. Über Nacht wurde durch mehrmaliges Wechseln von H_2O bidest überschüssige Perjodsäure ausgewaschen. Das klare Gel wurde mit Perjodsäure-Schiff-Reagenz (PAS, Merck) gefärbt (50 Minuten) und mit 0,5% Na-Bisulfit in H_2O reduziert (3 x 10 Minuten). Die Uberschußfärbung wurde unter Schütteln für 12 Stunden mit H_2O bidest herausgewaschen. Das Gel wurde in 7,5% Essigsäure gelagert und photographiert. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.) Färbung nach Glossmann und Neville (1971). Zur Elution des SDS und zur Fixierung der Proteine wurde das

Gel über Nacht in 40% Methanol und 7% Essigsäure gelegt. Die Oxidation der Proteine wurde für 60 Minuten im Dunkeln mit 1% Perjodsäure in 7% Essigsäure im Kühlraum durchgeführt. Anschließend wurde das Gel für 24 Stunden in 7% Essigsäure belassen, wobei mehrere Lösungswechsel stattfanden. Glykoproteine wurden ebenfalls im Dunkeln bei 4°C für 60 Minuten gefärbt und mit 1% Dithionit in 0,1 N HCl entfärbt und in dieser Lösung gelagert.

3.) Nach Segrest und Jackson (1972). Das Gel wurde in 40% Äthanol und 5% Essigsäure für 12 Stunden bei Raumtemperatur fixiert und für 2 - 3 Stunden mit 0,7% Perjodsäure in 5% Essigsäure behandelt. Direkt anschließend wurde das Gel zur Reduktion in 0,2% Metabisulfit in 5% Essigsäure mit einem Wechsel der Lösung nach 30 Minuten gelegt. Nachdem das Gel klar war, wurde es mit PAS-Reagenz überschichtet und für 18 Stunden bei Raumtemperatur in dieser Lösung belassen.

3.7.6.2 Dansylhydrazin-Färbung

Die Fixierung und Oxidierung der Proteine wurde nach Glossmann und Neville (1971) durchgeführt. Die Reduktion erfolgte mit 0,5% Na-Bisulfit in 5% Essigsäure für 1-1,5 Stunden, bis die Jod-Färbung des Gels verschwand. Danach wurde das Gel in die Färbelösung nach Eckhardt et al. (1976) gelegt. Diese bestand aus gleichen Teilen saurer DMSO-Lösung (0,6 ml HCl konz. / 1 Liter DMSO) und frisch zubereiteter Dansylhydrazin-Lösung (2 mg 5-Dimethylamino-1-naphthylaminsulfonylhydrazin / ml DMSO). Das Gel wurde in dieser Lösung für 2 Stunden in einer fest verschlossenen Box unter Schütteln bei 60°C inkubiert, und die Proteine anschließend mit Natriumborhydrid-Lösung (0,2 mg $NaBH_4$ / ml DMSO) im Gel reduziert. Nach Wässern der Gele wurde über Nacht in 1% Essigsäure

entfärbt. Als Kontrolle wurden alle Schritte ohne Perjodsäureoxidation durchgeführt. Die fluoreszierenden Banden wurden auf einem Chromato-Vue Transilluminator Modell C-62 (Hermle) bei 366 nm mit einem rotorangenem Filter photographiert (AgfaPan 25, Belichtung 100 s, Entwicklung des Films 5 Minuten).

3.7.6.3 Thymol-Schwefelsäure-Färbung

Das Gel wurde für 2 x 2 Stunden in einer fest verschließbaren Box bei Raumtemperatur unter Schütteln in 25% Isopropanol - 10% Essigsäure fixiert. Das Gel wurde für weitere 2 h in Thymol-Isopropanol-Essigsäure (0,2% : 25% : 10%) Lösung geschüttelt (Racusen, 1979). Nach Verwerfen der Lösung wurde eine Mischung aus 80% Schwefelsäure und 20% Äthanol hinzugefügt. Nach Inkubation für 2,5 Stunden bei 35°C traten rote Banden auf, die mit einem Grünfilter (525 nm) photographiert werden konnten. Als Kontrollproteine dienten das Glykoprotein Eialbumin und das nicht-kohlenhydrathaltige Rinderserumalbumin.

3.7.7 Partielle Hydrolysen der Isoenzymproteine

Für die Auftrennung der Peptide nach partieller Hydrolyse wurde das Gelsystem nach Laemmli (1970) angewendet. Die Gele wurden jedoch mit einer SDS-Konzentration von 0,4% und einer Acrylamidkonzentration von 15 - 20% gegossen.

Probengewinnung:
Die zu untersuchenden Proteine der Cyto-TIM und Cp-TIM wurden nach elektrophoretischer Auftrennung in SDS-Gelen durch Ausfällen des SDS-Protein-Komplexes mit KCl bzw. durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht und herausge-

schnitten. Nach einer Dialyse (vgl. oben) bzw. Waschen mit kaltem Methanol (50%) und H_2O bidest wurden die Proteine der Verdauung unterzogen. Um nicht fixierte Proteine in Gelstückchen direkt einer partiellen Hydrolyse unterziehen zu können, wurde nach denaturierender Elektrophorese in Gegenwart von SDS ein Absorptionsprofil bei 280 nm mit einer "Scan-Einrichtung" am Gilford Spektralphotometer 240 A aufgezeichnet. Die Gelbereiche mit den Proteinen der Triosephosphat Isomerase- Isoenzyme wurden aus dem Gel herausgeschnitten und im Reagenzglas verdaut (vgl. 3.7.7.2.).

3.7.7.1 Bromcyan-Spaltung

Spaltung der Proteine nach Nikodem und Fresco (1979) durch Bromcyan: Das Gelstück wurde in vorbereitete Reagenzgläser gelegt (ohne es zu zerstören!) und mit 20 µl einer Bromcyan-Lösung (250 mg Bromcyan/ 100 µl Acetonitril) zusammen mit 200 µl 125 mM Tris-HCl pH 6,8 und 200 µl 0,6 N HCl inkubiert. Als Kontrolle wurden die gleichen Lösungen mit Acetonitril, jedoch ohne Bromcyan verwendet.
Nach der Inkubation wurde das Gelstück 2 x 2 Stunden gegen 125 mM Tris-HCl pH 6,8 und 0,1% SDS dialysiert, um überschüssige HCl und Bromcyan herauszuwaschen. Danach wurde das Gel mit einem Spatel in die Taschen des Sammelgels geschoben und mit 125 mM Tris-HCl pH 6,8 - 10% Glycerin - 0,002% Bromphenolblau überschichtet. Die Peptide wurden für 15 Stunden bei 20 V und 7 mA bei Raumtemperatur aufgetrennt. Die Färbung des Gels erfolgte wie unter 3.7.1. beschrieben.

3.7.7.2 Partielle Hydrolyse mit Staphylococcus aureus V8-Protease und Papain

Es wurden zwei verschiedene Verdauungsverfahren durchgeführt:
1.) Hydrolyse im Reagenzglas vor der Elektrophorese: Gelstücke mit den Proteinen der Triosephosphat Isomerase-Isoenzyme wurden mit einem Glasstab zerkleinert und mit dem Probepuffer nach Cleveland et al. (1977) versetzt. Zu gegebenen Zeiten wurde die Hydrolyse durch Zugabe der Protease gestartet. Die Proteolyse wurde durch 2 minütiges Kochen im Wasserbad beendet. Das zerkleinerte Gel wurde mit dem Puffer und der Protease in die Taschen des Sammelgels gegeben. Die Peptide wurden für 15 Stunden bei Raumtemperatur in 15 - 20% Gradientengelen unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt.

2.) Hydrolyse im Sammelgel während der Elektrophorese: Fraktionen beider Isoenzyme, die durch nicht-denaturierende Gelelektrophorese gewonnen wurden (vgl. 3.7.2.), wurden mit 20% Glycerin in Probenpuffer nach Cleveland et al. (1977) versetzt und in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Darüber wurden die Proteasen in Probenpuffer mit 10% Glycerin geschichtet. Nach Sammeln der Proben und der Proteasen im Sammelgel (kurz vor dem Trenngel) wurde der Strom für 30 Minuten abgeschaltet. Nach der Hydrolyse wurden die Spaltprodukte über Nacht in einem 15 - 20% Gradientengel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt.

3.8 Isoelektrische Fokussierung

1.) In einer ISCO-Säule Modell 212
Die isoelektrische Fokussierung wurde bei 4°C durchge-

führt (Nelson et al., 1974). Als Spannungsquelle diente das ISCO-Electrophoresis Power Supply Modell 494.
Nach Einfüllen des Elektrodenpuffers (0,2% H_2SO_4 - 50% Saccharose) in die Anodenkammer (250 ml) und in den unteren Teil der Säule (7ml) wurde der Saccharosegradient aus je 8 ml 20% Saccharose in H_2O bidest + 2% Pharmalyte pH 4 - 6,5 + 10% Mercaptoäthanol und 5% Saccharose + 2% Pharmalyte pH 4 - 6,5 + 10% Mercaptoäthanol darübergeschichtet. Bis zum oberen Rand der Säule wurde mit 0,4%igem flüssigen Triäthanolamin (7ml) aufgefüllt. Die Kathodenkammer enthielt 250 ml des gleichen Puffers. Die pH-Gradient konnte sich in einem 10 stündigen Vorlauf bei maximal 3 Watt einstellen. Danach wurde die Probe mit 6% Saccharose (Endkonzentration) versetzt. 0,5 ml Probe wurde mit einer Kanüle in den Saccharosegradienten gespritzt und anschließend 15 Stunden fokussiert. Nach Beendigung des Laufs wurde der Saccharosegradient mit dem ISCO-Gradientenfraktionator Modell 640 in 0,6 ml-Fraktionen zerlegt. Die pH-Werte wurden sofort gemessen

2.) In einem Agarose Flachgel
Die isoelektrische Fokussierung wurde mit dem Flat Bed Apparatus FBE 3000 von Pharmacia durchgeführt.
Herstellen des Gels: Mit einem Tropfen Wasser wurde die Folie blasenfrei auf die austarierte Unterlage gelegt, der Gießrahmen über die Folie gelegt und befestigt. Pro 30 ml Gel wurden 0,3 g Agarose IEF (Pharmacia) und 3,6 g Sorbit in H_2O bidest aufgekocht. Nach Abkühlen auf etwa 70 - 75°C wurde Ampholine pH 3 - 6 (1,9 ml) hinzugefügt, gut mit der Agarose-Lösung vermischt und blasenfrei auf die Folie gegossen. Nach Polymerisation wurde das Gel aus der Halterung genommen und bei Raumtemperatur in einem feuchten Behälter für 12 - 16 Stunden gelagert. Zum Gebrauch wurde die Folie auf die austarierte Kühlplatte in der Fokussierungskammer gelegt. Elektroden-

schwämmchen wurden mit 1 N NaOH bzw. mit 0,05 M H_2SO_4 gut durchtränkt und an die Ränder des Gels gelegt. Bei Erreichen von 1500 V oder exakt nach 1,5 Stunden bei 15 Watt wurde das Gel aus der Kammer genommen, in Streifen längs der Laufrichtung geschnitten und diese in 1 mm breite Scheibchen fraktioniert. Die Proben wurden in Reagenzgläsern mit H_2O bidest überschichtet, eluiert, und die Enzymaktivität sowie der pH-Wert bestimmt.

3.9 Saccharosegradientenzentrifugation

Zur Bestimmung der Molekulargewichte der Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase wurden Saccharosegradientenzentrifugationen nach Martin und Ames (1961) und Siegel und Monty (1966) durchgeführt. Die Saccharosegradienten mit einem Volumen von 12 ml wurden mit einem LKB Ultrograd Gradientenmischer vorbereitet. Als Saccharosestammlösungen dienten 5% (w/v) und 20% (w/v) Saccharose in 50 mM Tris-HCl - 150 mM KCl - 20 mM MET pH 7,5. Es wurde ein linearer Gradient benutzt, der vor Gebrauch 18 Stunden gekühlt wurde. Die Eichproteine Cytochrom c (12,5 KD), Rinderserumalbumin (67 KD), Chymotrypsinogen A (25 KD) und Aldolase (160 KD) (je 100 µg in 100 µl H_2O bidest) wurden mit 100 µl Enzymextrakt gemischt und auf den Saccharosegradienten (20 - 5%) aufgetragen. In einem TST 41 Rotor wurden die Proteine 39 Stunden bei 190 000 x g auf einer Kontron TGA 65 Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die Gradienten wurden anschließend mit dem ISCO-Gradientenfraktionator Modell 640 in 0,4 ml-Fraktionen zerlegt und die Extinktion bei 280 nm aufgezeichnet.
Cytochrom c wurde photometrisch bei 415 nm gemessen; Chymotrypsinogen A und Rinderserumalbumin bei 280 nm; Aldolase und Triosephosphat Isomerase wurden enzymatisch bestimmt. Die Fraktionen mit der maximalen Extinktion

(Cytochrom c, Chymotrypsinogen A, Rinderserumalbumin) bzw. der maximalen Enzymaktivität der Aldolase wurden als Werte für die Eichgerade verwendet.

4. BESTIMMUNGSMETHODEN

4.1 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Neben den gebräuchlichen Trivialnamen werden die von der Enzyme Commission eingeführten systematischen Bezeichnungen und Nummern angegeben (Florkin und Stotz, 1973). Die Enzyme wurden bei 23°C Raumtemperatur am registrierenden Spektralphotometer Gilford 240 A mit Küvettenwechselautomatik gemessen. Die Aktivitäten werden als µmol umgesetztes Substrat pro Sekunde angegeben. Gemessen wurde die Oxidation des NADH als Extinktionsabnahme bei 340 nm.

Triosephosphat Isomerase:
(EC 5.3.1.1 D-Glyceraldehyde-3-phosphat ketol-isomerase)
Die Bestimmung der Aktivität beruht auf einem von Feierabend (1975) modifizierten Test nach Beisenherz (1955).

500 µl 0,2 M Triäthanolamin pH 7,6
290 µl H_2O bidest
50 µl Triton X-100
50 µl 4 mM NADH
5 µl Glycerin-1-Phosphat-Dehydrogenase (2 mg / ml 2,4 M Ammoniumsulfat)
5 µl Extrakt
Start der Reaktion durch Zugabe von
100 µl 15 mM D,L-Glycerinaldehyd-3-Phosphat.

Zur Aktivitätsbestimmung wurden die Extrakte soweit mit Aufschlußpuffer verdünnt, daß eine Extinktionsänderung

bei 340 nm von 0,05 pro Minute nicht überschritten wurde.

Bei Aktivitätstests mit Antikörpern wurde das H_2O bidest durch steigende Antiserenkonzentrationen ersetzt. Da Blut Triosephosphat Isomerase-Aktivität besitzt, mußte vorgereinigtes Antiserum eingesetzt werden (vgl. II. 5.1).

Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase:
(EC 4.1.2.13 D-Fructose-1,6-bisphosphate D-Glyceraldehyde-3-phosphate-lyase)
Die Aktivität wurde nach einer modifizierten Methode von Wu und Racker (1959) bestimmt:

880 µl 50 mM Tris-HCl pH 7,6
17 µl 15 mM NADH
33 µl 5,5 mM Fructose-1,6-Bisphosphat
10 µl Glycerin-1-Phosphat-Dehydrogenase / Triosephosphat Isomerase (2 mg /ml 2,4 M Ammoniumsulfat).
Start der Reaktion durch 60 µl Extrakt.

4.2 Proteinbestimmung

Das Gesamtprotein wurde mit Trichloressigsäure (Endkonzentration 10%) aus den verschiedenen Extrakten ausgefällt und bei 3 300 x g in der Hermle Z 316 Tischzentrifuge für 10 Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Sediment mit 5% TCA gewaschen und nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen. Das Sediment wurde in 0,5 ml 1 N NaOH gelöst und mit H_2O bidest auf 1 ml aufgefüllt. Der Proteingehalt wurde mit der von Gerhardt und Beevers (1968) modifizierten Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt. Die Reagenzien wurden jeweils frisch angesetzt.

1.) Alkalisches Kupferreagenz
1 Teil 2% $CuSO_4$ x 5 H_2O
1 Teil 2% Kalium-Natrium-Tartrat
20 Teile 10% Na_2CO_3 in 0,5 N NaOH

2.) Folin-Reagenz
1 Teil käufliches Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz
10 Teile H_2O bidest

Bestimmungsansatz:
1 ml Probe (gegebenenfalls verdünnen; Blindwert gegen H_2O) und
1 ml alkalisches Kupferreagenz mischen und nach fünf minütiger Inkubation bei Raumtemperatur unter kräftigem Mischen
3 ml Folin-Reagenz zugeben.

Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur 45 Minuten bis zur vollen Farbentwicklung inkubiert. Die Extinktion wurde bei 540 nm gegen den Wasserwert gemessen. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Eichkurve mit Rinderserumalbumin bestimmt.

4.3 Bestimmung der Saccharosekonzentration

Die Konzentration der Saccharose nach Fraktionierung der Gradienten wurden mit einem Zeiss Abbé-Refraktometer Modell A bestimmt.

4.4 Bestimmung der Leitfähigkeit

Die Leitfähigkeit wurde bei säulenchromatographischen Trennungen direkt während der Elution in einer Durchflußzelle am Leitfähigkeitsmeßgerät CDM 3 von Radiometer

Copenhagen gemessen.

5. IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

5.1 Herstellen der Antiseren

Zur Immunisierung wurden nicht reinrassige Kaninchen einer lokalen Tierhandlung (Bochum-Gerthe) im Alter von sechs bis zehn Wochen verwendet.
Die Kaninchen wurden einzeln in Metallkäfigen bei 25°C und 12 stündigem Licht-Dunkel-Wechsel in einem gut durchlüfteten Raum gehalten. Sie wurden mit dem Alleinfuttermittel für Mastkaninchen Kanin 4 (gepreßt) der Matador Mischfutterwerke GmbH & Co, Recklinghausen, gefüttert.
Die Immunisierung wurde wie von Berzborn (1980) beschrieben durchgeführt. Vor der Immunisierung wurden 20 ml Blut aus der rechten Ohrvene entnommen, um zu prüfen, ob unspezifische Präzipitationen während der Untersuchungen auftreten. Als Antigene wurden elektrophoretisch gereinigte, aus dem Gel eluierte und über Ficoll 400 eingeengte Proteine der Triosephosphat Isomerase-Isoenzyme benutzt. Je 50 µg wurden mit 0,5 ml 50 mM Tris-HCl pH 6,8 und mit 1,5 ml Freud's Adjuvant complete (Difco) versetzt und über Sonifikation zu einem steifen Schaum (10 - 30 s in Eis) geschlagen. Die Injektionen wurden intradermal auf vier Stellen des Rückens verteilt. Nach vier Wochen wurden gleiche Proben (40 bzw. 60 µg in 0,15 M NaCl) ins linke Ohr intravenös gespritzt, jedoch ohne Adjuvans. Am siebten, neunten und elften Tag nach dieser "Booster"-Injektion wurden je 50 - 60 ml Blut aus der rechten Ohrvene entnommen, 5 Stunden bei Raumtemperatur und über Nacht im Kühlraum stehengelassen. Der agglutinierte Blutkuchen wurde vorsichtig von der Wand des Reagenzglases gelöst, und das Serum in Zentrifugengläschen dekantiert. Nach 10 Minuten

Zentrifugation bei 12 000 x g wurde das Serum in Ampullen überführt, eingeschmolzen und bei -20°C gelagert.

5.2 Reinigung der Antiseren

Zu je 20 ml Serum wurde 5 g festes, fein pulverisiertes Ammoniumsulfat (41% Endkonzentration) unter Rühren bei Raumtemperatur zugefügt, und die Lösung für 20 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach Zentrifugation für 30 Minuten bei 4000 x g wurde das Sediment mit 1,75 M Ammoniumsulfat zweimal gewaschen, zentrifugiert und die Überstände (Albumin, Transferrin, α-Protein, einschließlich Haptoglobulin und Hämoglobin) verworfen. Der Niederschlag wurde in wenig H_2O bidest resuspendiert und für 2 x 12 Stunden gegen H_2O bidest bei 4°C dialysiert. Es bildete sich ein weißer Niederschlag aus, der durch Zentrifugation abgetrennt und verworfen wurde (Lipoproteine). Die Lösung wurde 24 Stunden gegen 50 mM NaAc - 21 mM HOAc-Puffer pH 5,0, 2 x 12 Stunden gegen H_2O bidest und erneut 24 Stunden gegen den Acetat-Puffer dialysiert. Wenn das Volumen nach der Dialyse zu groß war, wurde erneut durch Ammoniumsulfatfällung konzentriert und gegen 0,1 M NaCl - 0,015 M Na-Azid dialysiert. Das Serum wurde bei 4°C gelagert. Die bei Harboe und Ingild (1973) angegebene säulenchromatographische Abtrennung der IgG und IgA von IgM wurde nicht durchgeführt.

5.3 Puffersystem

Es wurde der Tris-Barbiturat-Puffer (Puffer A) von LKB benutzt, der in einer 5-fach konzentrierten Stammlösung angesetzt wurde:
44,3 g Trizma Base (Sigma), 22,4 g Diäthylbarbitursäure,

0,65 g Natriumazid, 0,53 g Calziumlactat pH 8,6 ad 1000 ml H_2O bidest. Zur Herstellung der Gele wurde der Puffer 1 + 9 mit H_2O bidest verdünnt. Als Elektrodenpuffer wurde er in 5-facher Verdünnung verwendet.

5.4 Einfach-Immunodiffusion

Zur Herstellung der Gele für die Immunodiffusion nach Mancini et al. (1965) wurden 1,2 g Agarose (Sigma) in 100 ml 1 + 9 verdünnten Puffer A aufgekocht. Je 25 ml heiße Agarose wurden auf 10 x 10 cm große Glasscheiben, die in einem Rahmen liegen, ausgegossen. Nach Erstarren der Agarose wurden 81 cm^2 Gelfläche entfernt und durch Erhitzen im Wasserbad erneut geschmolzen. Nach Abkühlen der Agarose auf 55 - 50°C wurden je 2 ml vorgereinigtes Antiserum gegen die Triosephosphat Isomerase-Isoenzyme hinzugefügt und das Gel wieder auf die Glasscheibe gegossen. Das erstarrte Gel wurde über Nacht in einer feuchten Kammer kühl aufbewahrt. Vor Gebrauch wurden Löcher aus dem Antiserum-haltigen Agarosegel gestanzt und mit den zu untersuchenden Proben gefüllt.
Die Extrakte wurden von Roggenkeimlingen hergestellt, die bei 22°C bzw. 32°C in Dauerlicht und bei 22°C in Dunkelheit gezogen wurden. Je 10 Primärblätter wurden nach 24, 48, 72, 96, 120 und 144 Stunden Keimungsdauer in je 2 ml 25 mM Kaliumphosphat-Puffer - 20 mM MET pH 8,6 homogenisiert und klarzentrifugiert. Von den Primärblättern der Pflanzen die bei 32°C gezogen wurden, wurde nur die untere chlorotische Hälfte verwendet. Zur Diffusion wurden die Gele für 48 Stunden in den Kühlraum gestellt.
Um nicht präzipitierte Serumproteine und Extraktproteine zu entfernen, wurde das Gel 6 x 12 Stunden in 2% NaCl - 1% Triton-X-100-Lösung gewaschen und für 48 Stunden in H_2O bidest belassen. Das Gel wurde danach mit einem

feuchten Filterpapier bedeckt und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Gele wurden für 10 Minuten in einem Färbegemisch aus 0,1% Amido-Schwarz - 45% Methanol - 10% Eisessig gefärbt und in der gleichen Lösung ohne Amido-Schwarz entfärbt.

5.5 Doppeldiffusion

Für die Doppeldiffusion nach Ouchterlony (1962) wurden 0,8% Agarosegele auf geschliffenen Objektträgern (26 x 76 mm; Camag) wie oben hergestellt. Pro sechs Objektträger wurden 25 ml Gel benötigt. Nach Erstarren des Gels und einer 12 stündigen Lagerung bei 4°C im Kühlraum wurden Lochmuster (Camag) ausgestanzt und mit Extrakten bzw. Antiseren gefüllt, die gegeneinander für 48 Stunden im Kühlraum diffundierten. Waschen, Trocknen und Färben der Gele wurde wie unter 5.4. beschrieben durchgeführt.

5.6 Immunelektrophorese

Zur Immunelektrophorese nach Grabar und Williams (1953) wurden 0,8% und 1,2%ige Agarosegele verwendet. Vor der Diffusion wurde das Proteingemisch oder das reine Protein elektrophoretisch bei 250 V für 3 Stunden im Kühlraum aufgetrennt (6 cm Wanderungsstrecke). Parallel zur Elektrophoreserichtung wurden Rinnen ausgehoben und mit Antiseren gefüllt. Die Diffusion erfolgte für 48 Stunden im Kühlraum. Waschen, Trocknen und Färben der Gele wurde wie unter 5.4. beschrieben durchgeführt.

5.7 Gekreuzte Immunelektrophorese

Für gekreuzte Immunelektrophoresen nach Laurell (1965)

und Clarke und Freeman (1966) wurden 0,8%ige Agarosegele und 1,2%ige Agarosegele mit 2,5% Antiserum benötigt. In dem 0,8%igen Agarosegel wurde wie unter 5.6. eine Elektrophorese durchgeführt. Der sechs cm lange Gelstreifen mit den aufgetrennten Proteinen wurde mit heißer Agarose längs seiner Laufrichtung gegen das Antiserumhaltige Agarosegel eingebettet. Es folgte eine zweite Elektrophorese, die senkrecht zur Laufrichtung der getrennten Proteine durchgeführt wurde. Bei 10 mA pro Gel dauerte die Elektrophorese bis zur vollständigen Präzipitation etwa 12 bis 18 Stunden. Waschen, Trocknen und Färben der Gele wurde wie unter 5.4. beschrieben vollzogen.

III. ERGEBNISSE

1. TRENNUNG, REINIGUNG UND PRÄPARATION DER TRIOSEPHOSPHAT ISOMERASE-ISOENZYME

Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit befaßte sich mit dem Problem, ein Reinigungsverfahren für die multiplen Formen der Triosephosphat Isomerase (TIM) aus Blattgeweben des Winterroggen zu erarbeiten. Bislang sind Proteine mit TIM-Aktivität nur aus Mikroorganismen (Artavanis-Tsakonas und Harris, 1980) und tierischen Geweben (Meyerhof und Kiessling, 1935; Krietsch et al., 1970 a/b) isoliert und gereinigt worden. Versuche, pflanzliche TIM zu reinigen, sind von Riese (1976) und Kurzok (1977) durchgeführt worden. Über eine selektive Aussalzung mit Ammoniumsulfat, Adsorption an Calziumphosphat, durch zwei verschiedene Anionenaustauscherchromatographien und eine präparative Elektrophorese wurden die Isoenzyme der TIM getrennt und gereinigt.
Das Reinigungsverfahren blieb aber unbefriedigend, da es zu lange dauerte, zuwenig reines Enzymprotein isoliert werden konnte, und die Präparation des plastidären Isoenzyms häufig von Fremdproteinen nicht abgetrennt werden konnte. In dem in dieser Arbeit verwendeten Verfahren gelang es, große Mengen Pflanzenmaterial in relativ kurzer Zeit (8 - 10 Tage) mit hoher Ausbeute an reinen Isoenzymproteinen zu gewinnen. Die Grundschritte selektives Aussalzen und Anionenaustauscherchromatographie wurden beibehalten und durch andere Trenn- und Reinigungsmethoden erweitert. Da sich die TIM-Isoenzyme als halophil und basophil erwiesen, konnten unter Anwesenheit von Salzen (KCl, Ammoniumsulfat) Säurefällungen, Gelfiltrationen und Aussalzerchromatographien eingesetzt werden. Zusätzlich stabilisierend wirkten das im Aufschluß-Puffer verwendete Polyvinylpyrrolidon (PVP) (Anderson, 1968) und der Serin-Protease-Hemmstoff Phenyl-

methylsulfonylfluorid (PMSF), die die Oxidation und den proteolytischen Abbau des Enzyms verhinderten ((Prouty und Goldberg, 1972).

Die Erarbeitung eines effektiveren Reinigungsvorgangs war für die Charakterisierung der Isoenzymproteine auf molekularer Ebene erforderlich, da reine Proteine in ausreichenden Konzentrationen benötigt wurden.

Eine Übersicht über den Ablauf und die dabei erzielten Ergebnisse sind in den Tabellen 3 und 4 zusammengefaßt. Die einzelnen Schritte werden im folgenden näher beschrieben.

1.1 Fällungsmethoden

1.1.1 Ammoniumsulfatfällungen

Der erste Schritt zur Konzentrierung der Proteine ist das häufig eingesetzte Verfahren des Aussalzens mit Neutralsalzen. Ammoniumsulfat entzieht den Proteinen die Hydrathülle, so daß diese ausfallen. Da Proteine mit unterschiedlicher Ladung und Größe verschieden lang in salzhaltiger Umgebung in Lösung bleiben können, können sie so voneinander getrennt werden. Durch Zugabe von Wasser lassen sich die Proteine wieder lösen.
Die Triosephosphat Isomerase konnte aus dem Rohhomogenat zwischen 40 und 80% Ammoniumsulfat-Endkonzentration mit Ausbeuten um 90% angereichert werden.

1.1.2 Säurefällungen

Bei Untersuchungen der Triosephosphat Isomerase-Akti-

vität in Abhängigkeit von der H^+-Konzentration konnte gezeigt werden, daß beide Formen der TIM nach Dialyse in salzfreiem Medium bei pH-Werten unter 5,5 inaktiviert (Kurzok, 1977) wurden. Bei Anwesenheit von 20% Ammoniumsulfat, einer Konzentration, bei der die TIM-Proteine noch nicht gefällt wurden, konnte der pH-Wert auf 4,6 gesenkt werden, ohne das TIM-Aktivität verloren ging (Abb.:1). Bei H^+-Konzentrationen unter 4,6 wurde auch die Triosephosphat Isomerase denaturiert.

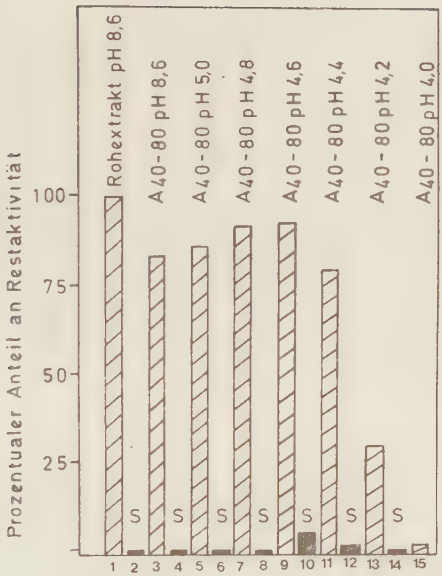


Abb.1: Abhängigkeit der Triosephosphat-Isomerase-Aktivität nach Säurefällung eines 40-80%igen Ammoniumsulfat-Präzipitats, das in Phosphat-Puffer pH 8,6 resuspendiert und mit Puffer auf 20% Ammoniumsulfat-Endkonzentration eingestellt wurde. Der Rohextrakt (1) wurde mit Ammoniumsulfat (40-80%) konzentriert, das resuspendierte Präzipitat zentrifugiert und die Triosephosphat Isomerase-Aktivität im Überstand (3) und im Sediment (4) gemessen. Der Überstand (3) wurde in sechs gleich große Fraktionen aufgeteilt, die auf einen der oben angegebenen pH-Werte eingestellt und zentrifugiert wurden. Die Überstände wurden mit 1 N KOH auf pH 8,6 eingestellt. Die Aktivitäten sind als Prozent der Gesamtaktivität im Rohextrakt dargestellt (5, 7, 9, 11, 13, 15; schraffierte Säulen). Die Sedimente (S) wurden in Phosphat-Puffer pH 8,6 resuspendiert, und die Aktivität der Triosephosphat Isomerase gemessen (6, 8, 10, 12, 14; schwarze Säulen).

Dieses Verfahren bot sich nach Ammoniumsulfatfällungen an. Routinemäßig wurde die Säurefällung nach der dritten Ammoniumsulfatfällung durchgeführt, wobei nach dem Resuspendieren des Sediments die Leitfähigkeit auf 550 - 500 mS ≙ 21 - 18% Ammoniumsulfat eingestellt wurde. Der pH-Wert der Lösung wurde auf 4,7 erniedrigt, wobei keine Triosephosphat Isomerase, jedoch ein beträchtlicher Anteil an Fremdprotein präzipitiert wurde.
Offensichtlich wurden durch Ammoniumsulfateinwirkung säurelabile Gruppen am Enzymprotein stabilisiert. Der Nutzen der Säurefällung besteht in einer Erhöhung der spezifischen Aktivität um den Faktor 6,5.

1.1.3 Andere Fällungen

a.) Die von Beisenherz (1955) für die Präparation der Triosephosphat Isomerase aus Kaninchenmuskel angewandte Methode, mit kaltem Aceton Proteine zu fällen, wurde auch für die TIM aus Roggenkeimlingen eingesetzt.
Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2 : Aktivitäten der Triosephosphat Isomerase nach stufiger Acetonfällung am ersten und zweiten Tag in µmol umgesetztes Substrat x s^{-1} x ml^{-1}.

Schritt	1. Tag		2. Tag	
	Überstand	Sediment	Überstand	Sediment
Rohextrakt	188	0	0	0
Aceton 0 - 20%	177	0,97	0	0
Aceton 20 - 40%	100	80	0	0
Aceton 40 - 60%	93	0	0	0
Aceton 60 - 70%	0	0	0	0

Da die Triosephosphat Isomerase nicht mehr re-aktiviert werden konnte, wurde diese Methode verworfen.

b.) Hackert et al. (1977) beschrieben für die Reinigung der Isocitrat Dehydrogenase die Fällung der Proteine durch Polyäthylenglykol (PEG). Bei den für die Isocitrat Dehydrogenase verwendeten Konzentrationen an PEG konnte kein TIM-Protein sedimentiert werden. Bei noch höheren PEG-Konzentrationen konnte zum Teil das Polyäthylenglykol nicht mehr in Lösung gebracht werden. Anschließende Ammoniumsulfatfällungen erzeugten ein "floating pellet" während der Zentrifugation, so daß das Sediment zwischen dem viskösen PEG und dem klaren Überstand lag. Daher wurde diese Methode ebenfalls verworfen.

1.2 Säulenchromatographische Methoden

1.2.1 Anionenaustauscherchromatographie

Das Trennprinzip der Anionenaustauscherchromatographie beruht auf einer reversiblen Adsorption der Proteine an die Bindungsgruppen (DEAE) der Matrix. Freie Ladungen der Proteine und die Ionenstärke sowie der pH-Wert des Puffers beeinflussen die Wechselwirkung zwischen den Proteinen und der Matrix. Durch Veränderungen der Ionenstärke bzw. des pH-Wertes lassen sich Proteine eluieren.

Für die Präparation der Triosephosphat Isomerase wurden drei verschiedene Matrizes getestet, die DEAE als Bindungsgruppe gekoppelt hatten: 1) DEAE-Zellulose, 2) DEAE-Sephadex A 50 und 3) DEAE-Sepharose CL-6B.
In dem bereits in der Diplomarbeit (Kurzok, 1977) erarbeiteten Trennverfahren zeigte sich eine schlechte Lauf- und Trenneigenschaft der Zellulose, was sich besonders in einem starken "tailing" bemerkbar machte. Bei DEAE-

Sephadex A 50 schrumpfte das Gelbett während der Elution mit hoher Salzkonzentration (0,3 M KCl) auf die Hälfte zusammen. Dadurch wurde der positive Effekt, die Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülgröße ("Sievorptive" chromatography, Kirkegaard, 1973) aufgehoben.
Die DEAE-Zellulose und DEAE-Sephadex A 50 wurden später für präparative Arbeiten nicht mehr eingesetzt.
Dagegen zeichnete sich DEAE-Sepharose CL-6B durch sehr gute Laufeigenschaften, gute Proteintrennungen und einer 100%igen Ausbeute aus. Es wurden weder "tailing" noch Schrumpfungen des Gelbetts beobachtet.
Es wurde versucht, durch verschiedene Elutionsmittel Fremdproteine abzutrennen. Die Elution mit KCl wurde durch EDTA ersetzt. Die Reinigung ist im Vergleich zu KCl-eluierten Proben außerordentlich gut, jedoch wurden die Eigenschaften der Triosephosphat Isomerase-Proteine unter der Einwirkung von EDTA verändert. Wahrscheinlich hat EDTA durch seine hohe negative Ladung eine große Bindungsfähigkeit zu den Proteinen der Triosephosphat Isomerase. EDTA bindet so stark, daß durch Dialyse gegen Puffer und zweiwertige Ionen (Mg^{2+}) ein Austausch oder Abtrennen des EDTA nicht erreicht werden konnte. Durch Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, daß die unter normalen Bedingungen unterschiedlich großen Wanderungsgeschwindigkeiten der beiden Isoenzyme der TIM nach Elution mit EDTA gleich groß waren. Somit konnten die Isoenzyme nicht mehr unterschieden werden. Daher wurde EDTA nicht zur Elution verwendet.

Eine weitere Möglichkeit, die Isoenzyme der TIM auf DEAE-Sepharose CL-6B zu trennen, wurde durch die Erhöhung der Ionenstärke des Puffers erreicht. Steigende Molaritäten verringern die Bindungsfähigkeit des Liganden. Die Aktivität wird durch die hohen Phosphat-Konzentrationen zwar gehemmt (vgl. Anderson, 1971a; Turner et al., 1965), läßt sich aber nach Dialyse oder

Ausfällen mit Ammoniumsulfat wieder herstellen.
Nach selektivem Aussalzen, einer Säurefällung und einer Anionenaustauscherchromatographie liegen die cytoplasmatischen und plastidären Isoenzyme voneinander getrennt und hochgereinigt vor (Abb.2).

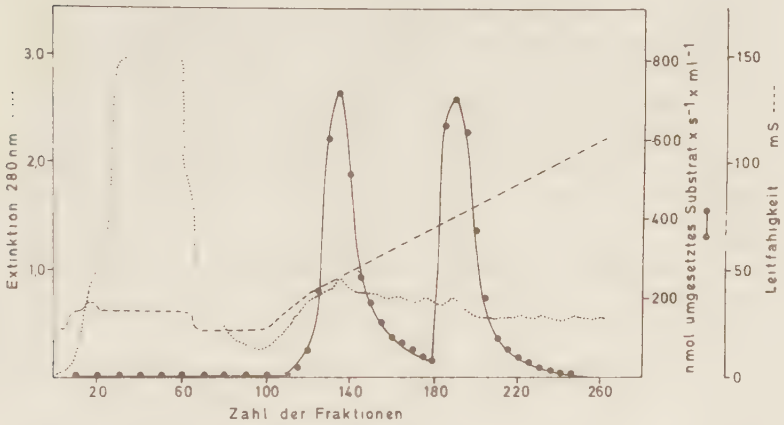


Abb.2: Darstellung des Elutionsprofils eines durch Ammoniumsulfat konzentrierten und durch Säurefällung vorgereinigten Blattextraktes von Roggenkeimlingen, die bei 22°C im Dauerlicht gezogen wurden, nach Chromatographie an DEAE-Sepharose CL-6B. Die Isoenzyme wurden durch lineare Erhöhung der Molarität des Phosphat-Puffers eluiert. Bei einem Gelbettvolumen von 75 cm^3 wurde mit einem Gradienten von 2 x 1000 ml 25 mM KPO_4-Puffer-20 mM MET-0,5 mM PMSF, pH 8,6 und 200 mM KPO_4-Puffer-20 mM MET-0,5 mM PMSF, pH 8,6 eluiert (Methode II.3.3.).

1.2.2 Gelfiltration an Ultrogel AcA 44

Die Verfahren der Trennung aufgrund unterschiedlicher Löslichkeit und freier Ladung wurden durch die Gelfiltration erweitert.
Die Methode, Proteine nach ihren Molekulargewichten aufzutrennen, ist seit langem bekannt und vielfach effektiv eingesetzt worden (Andrews, 1965). Proteine unterschiedlicher Größe können verschieden schnell eine unsubstituierte Matrix (Agar, Sephadex, Ultrogel) mit bekannter Porengröße permeieren. Je größer ein Molekül ist, desto geringer ist die Wechselwirkung zwischen Matrix und Protein, und um so schneller eluiert es.

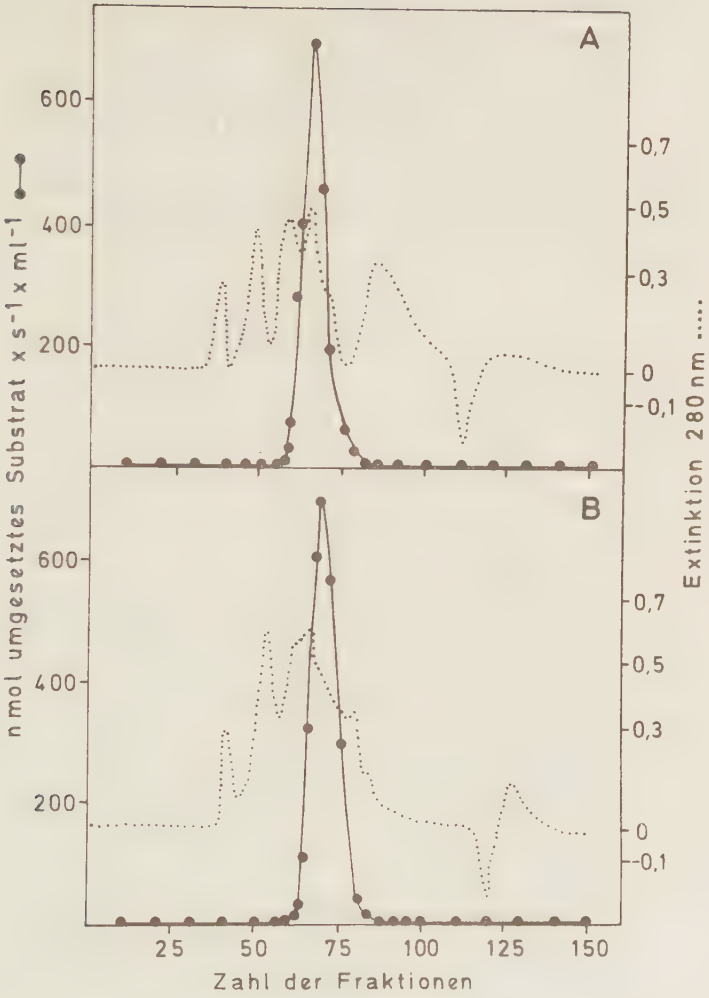


Abb.3: Darstellung der Elutionsprofile vorgereinigter und getrennter Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase nach Gelfiltration an Ultrogel AcA 44 (3,2 x 180 cm).

Die Gelfiltration wurde an Ultrogel AcA 44 durchgeführt, da sich im Vergleich Sephadexgele wegen ihrer schlechten Laufeigenschaften und einer Inaktivierung der Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase als ungeeignet erwiesen. In Abbildung 3 sind Elutionsprofile für die TIM-Isoenzyme an Ultrogel AcA 44 dargestellt. Die Gelfiltration kann nur zur weiteren Reinigung bereits getrennter Isoenzyme eingesetzt werden, aber nicht zur Trennung der Isoenzyme selbst.

1.2.3 "Salting-Out"Chromatographie

Proteine können aus Lösungen mit Ammoniumsulfat durch den Entzug der Hydrathülle ausgefällt werden oder im präzipitierten Zustand durch Zugabe von Wasser wieder gelöst werden. Von der Haar (1976) entwickelte daraus eine säulenchromatographische Methode. Proteine werden mit Ammoniumsulfat versetzt, bis sie ihre Präzipitationskonzentration erreicht haben, und auf unsubstituierte Agarosegele geschichtet. Die Hydrathüllen der Agarosemoleküle und der Proteine sind verschieden groß. Durch diese Wechselwirkung zwischen Geloberfläche und Protein fallen die Proteine bei geringeren Ammoniumsulfatkonzentrationen aus. Die Affinität der Agarose zu Wasser ist größer als die der Proteine zu Wasser. Wie groß dieser Unterschied zwischen der Präzipitation nach stufig steigender Ammoniumsulfatkonzentration und einer Elution mit linear abfallenden Ammoniumsulfatkonzentrationen nach Säulenchromatographie ist, zeigt die Abb. 4. Ein Aussalzen der TIM-Isoenzyme in wäßrigen Lösungen bedarf einer Stufe von 40 - 80% an Ammoniumsulfatendkonzentration. Nach der chromatographischen Methode werden die Isoenzyme zwischen 35 - 29% eluiert. Ein ähnliches Verhalten zeigen die von Von der Haar (1976) isolierten t-RNA-Synthetasen. Die Methode hat sich für die Auf-

bereitung der Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase als effektiv erwiesen, konnte aber nur zur Reinigung, jedoch nicht zur Trennung der Isoenzyme eingesetzt werden. Beide Isoenzyme gehen bei gleicher Ammoniumsulfatkonzentration wieder in Lösung. (Abb. 5).

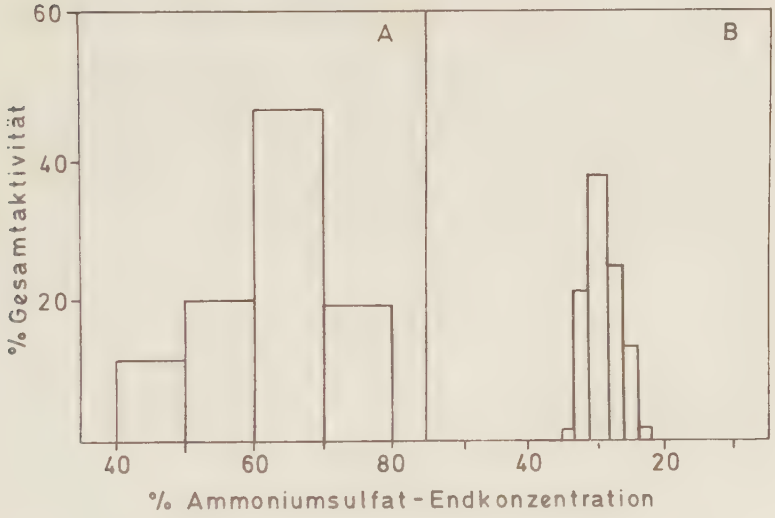


Abb.4: Präzipitierbarkeit (A) und Löslichkeit (B) der Triosephosphat Isomerase-Proteine durch ansteigende bzw. fallende Ammoniumsulfatkonzentrationen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Gesamtaktivität.
A: Selektive Fraktionierung der Proteine in einem wäßrigen Extrakt durch stufig steigende Ammoniumsulfatkonzentration zwischen 40 und 80%.
B: Löslichkeit präzipitierter Triosephosphat Isomerase-Proteine durch Elution mit kontinuierlich fallenden Ammoniumsulfatkonzentrationen nach "Salting-Out"-Chromatographie an Sepharose 4B.

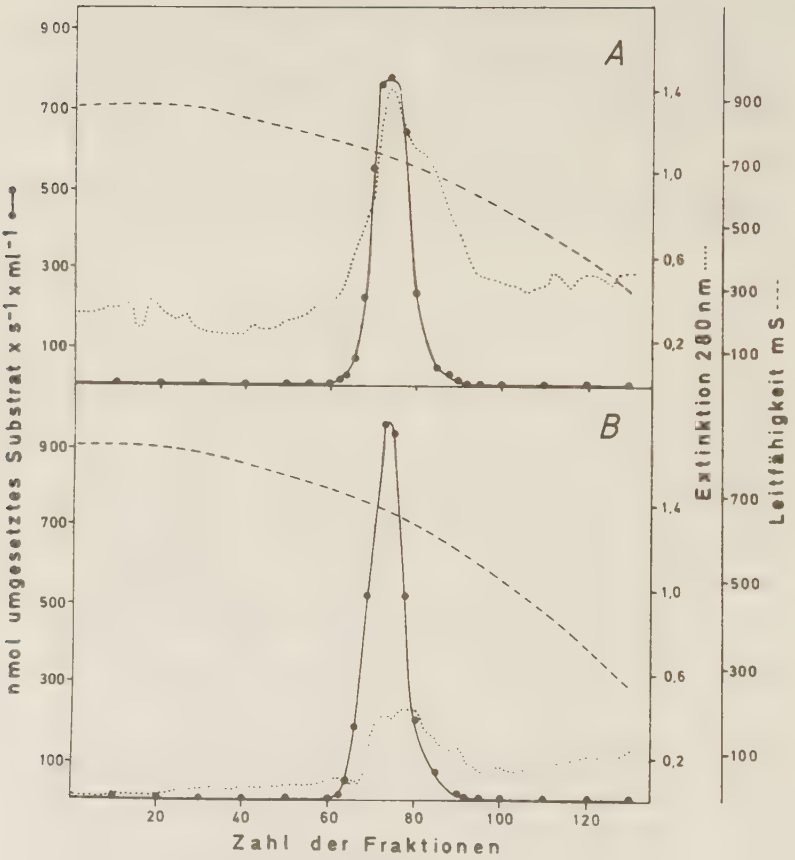


Abb.5: Darstellung der Elutionsprofile der durch Anionen-Austauscher-Chromatographie an DEAE-Sepharose Cl-6B getrennten cytoplasmatischen (A) und plastidären (B) Formen der Triosephosphat Isomerase nach "Salting-Out"-Chromatographie an Sepharose 4B. Die Isoenzyme wurden mit einem kontinuierlich fallenden Ammoniumsulfatgradienten von 2 x 600 ml 80% und 10% Ammoniumsulfat in Phosphat-Puffer pH 7,2 bei einem Gelbettvolumen von 70 cm^3 eluiert.

1.2.4 Andere Verfahren

Trotz der verschiedenen Trennprinzipien der Fällungen, Anionenaustauscherchromatographie, Gelfiltration und der "Salting-Out"-Chromatographie konnten die Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase nicht vollständig von Fremdproteinen befreit werden. Daher wurden weitere chromatographische Verfahren eingesetzt.

Nach Hemmstoffversuchen konnte festgestellt werden, daß am oder in der Nähe des aktiven Zentrums der Isoenzyme mehrere SH-Gruppen liegen müssen. Deshalb wurde eine Chromatogrphie an aktivierter Thiolsepharose 4B durchgeführt. Die Isoenzyme wurden jedoch nicht kovalent am Gel gebunden, sondern eluierten mit dem Leervolumen der Säule.

Auch die Affinitätschromatographie an Phospho-Zellulose nach Heil und Lebherz (1978) blieb erfolglos. Die multiplen Formen der TIM eluierten im Nachwaschen der Saule. Für andere Enzyme aus Blattextrakten des Roggen konnte die Phospho-Zellulose-Chromatographie erfolgreicher eingesetzt werden. Unter den gegebenen Bedingungen konnten folgende Enzyme an Phospho-Zellulose adsorbiert und mit ihren Substraten eluiert werden: Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat Dehydrogenase, Hexosephosphat Isomerase und Phosphoglucomutase.

Die Affinitätschromatographie an Concanavalin A - Sepharose ist eine weitere Möglichkeit, auf gruppenspezifische Eigenschaften der Enzyme einzugehen. Concanavalin A bindet Moleküle, die α-D-Mannopyranosyl, α-D-Glucopyranosyl und strukturverwandte Reste enthalten (Pharmacia). Da das plastidäre Isoenzym der Triosephosphat Isomerase durch Färbung mit dem Thymol-Schwefelsäure-Reagenz (vgl. III.2.3.) als Glykoprotein identifiziert

werden konnte, wurde versucht, das Enzym an Concanavalin A zu adsorbieren. Nach dreimaligem vergeblichen Versuch mit je 1 ml Gelvolumen, das plastidäre Isoenzym der TIM an die Liganden zu binden, wurde die Methode vorerst unberücksichtigt gelassen.

Chromatographie an dem Kationenaustauscher Carboxymethyl-Zellulose konnte erfolgreicher eingesetzt werden, als die oben beschriebenen Methoden. Bei pH-Werten von 4 bis 4,3 konnten beide Isoenzymformen an das Gel gebunden werden. Sie wurden mit einem kontinuierlich steigenden pH-Gradienten von pH 4 bis pH 6 eluiert, sofort mit 1 M K_2HPO_4 auf schwach basische pH-Werte eingestellt, und ihre Aktivität wurde getestet. Doch obwohl beide Isoenzyme nach den vorangegangenen Reinigungsschritten durch Carboxymethyl-Zellulose rein erhalten werden konnte, wurde die Methode nicht in das routinemäßige Reinigungsverfahren aufgenommen, da Aktivitätsverluste von 90 - 95% aufgrund des niedrigen pH-Wertes und des salzfreien Puffers unvermeidlich waren.

1.3 Gelelektrophoretische Reinigung

Die Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase konnten durch säulenchromatographische Verfahren unter Erhalt der vollen Aktivität nicht ganz von Fremdproteinen abgetrennt werden, so daß die Polyacrylamidgelelektrophorese zur Gewinnung reiner Proteine eingesetzt wurde.
Die Elektrophorese arbeitet unter nativen Bedingungen nach verschiedenen Prinzipien. Sie trennt Proteinmoleküle nach Form, Größe und Nettoladung. Der Vorteil gegenüber einer Säulenchromatographie ist die bessere Auflösung der Proteine, die durch den Widerstand hochprozentiger Gele zu scharfen Banden fokussiert werden. Für eine präparative Isolierung ist es aber sinnvoll, hoch

angereicherte Proteinfraktionen zu verwenden, die wenig Fremdprotein in unmittelbarer Nähe des zu extrahierenden Gelstückes aufweisen. Nachteilig wirkt sich die schlechte Extrahierbarkeit von Proteinen aus den Gelen aus. Durch Diffusion der im Gel eingeschlossenen Proteine können maximal 25 - 30% wiedergewonnen werden.

Das native Gelsystem 1 nach Maurer (1971) wurde aufgrund unzureichender Auftrennung durch das Gelsystem von Laemmli (1970) ersetzt. Unter Verwendung der Lösungen ohne Natriumdodecylsulfat wurden die Konzentrationen für ein 7,5% Gel modifiziert. Das Resultat der Präparation und den Nachweis der Reinheit der Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase zeigt Abb. 6.

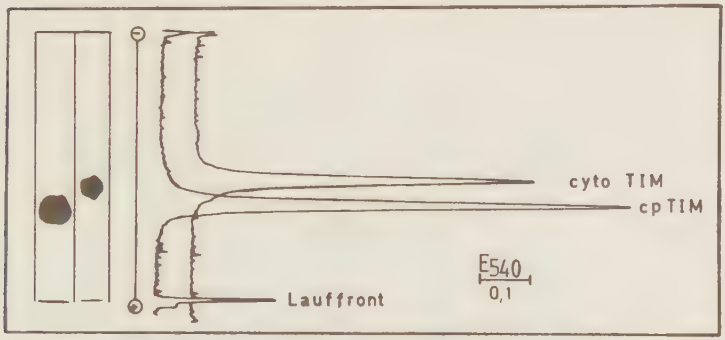


Abb.6: Densitogramme gereinigter Proteine der cytoplasmatischen (cyto TIM) und der plastidären (cp TIM) Formen der Triosephosphat Isomerase (rechts) nach Elektrophorese in einem 7,5% Gel, die mit Coomassie Brilliant Blue G-250 angefärbt wurden (links).

1.3.1 Aktivitätsfärbung

Die Gelelektrophorese kann nicht nur als Kontroll- und Reinigungsverfahren eingesetzt werden, sondern auch zum Nachweis aktiver Enzyme oder multipler Formen.

Scopes beschrieb 1968 einen Aktivitätstest für die Triosephosphat Isomerase aus Kaninchenmuskel, dessen Reaktionsverlauf in Abb. 7 dargestellt ist.

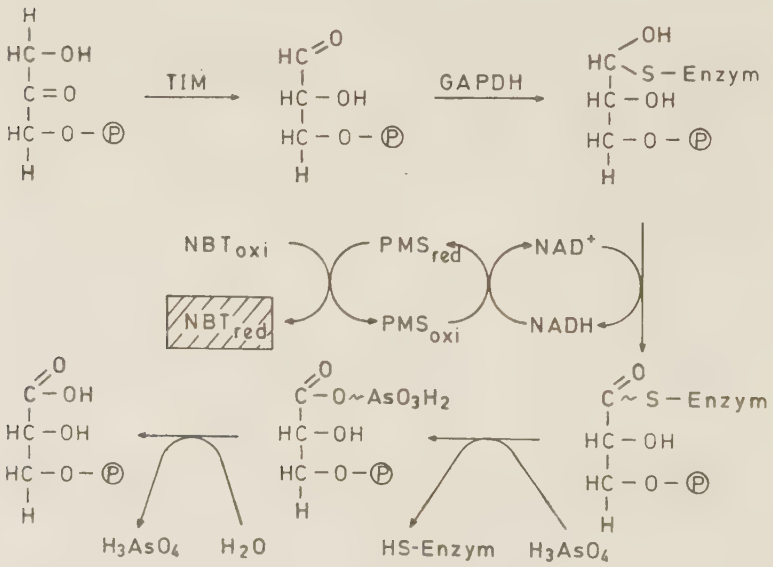


Abb.7: Schematische Darstellung des Reaktionsverlaufs der Aktivitätsfärbung der Triosephosphat Isomerase nach Scopes (1968). NBT_{red} ist das sichtbare Produkt des mit einer Farbreaktion gekoppelten Enzymtests (Schraffiert).

Das Substrat Dihydroxyacetonphosphat wird durch die Triosephosphat Isomerase in die isomere Form Glycerinaldehyd-3-Phosphat überführt, und dieses durch die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase zu 3-Phosphoglycerinsäure oxidiert. Bei der Oxidation werden die Protonen von NAD^+ übernommen und über den Elektronencarrier Phenanzinmetosulfat (PMS) auf den Farbstoff Nitroblautetrazolium (NBT) übertragen. Dieser wird durch die Reduktion von einem farblosen in einen farbigen Zustand überführt. Nach einer Gelelektrophorese wird die Lage der Triosephosphat Isomerase im Gel durch das reduzierte Tetrazoliumsalz sichtbar gemacht. Aus Abb. 8 ist ersichtlich, daß ein Blattextrakt sechs Tage alter Roggenkeimlinge zwei verschiedene Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase mit unterschiedlichen Ladungseigenschaften enthält. Die gereinigten Proteine (2,3) besitzen Triosephosphat Isomerase-Aktivität.

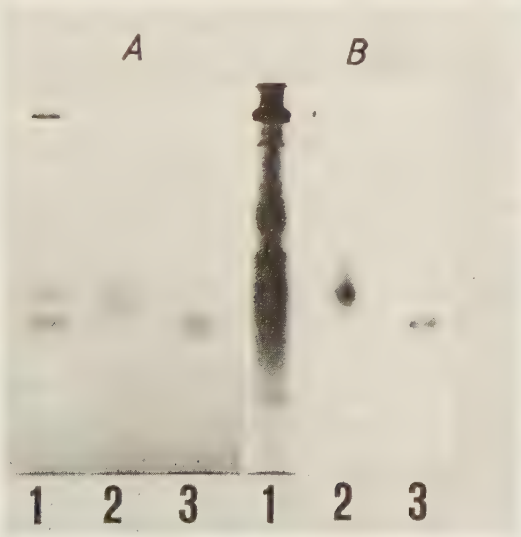


Abb.8: Darstellung der Aktivitätsfärbung der Triosephosphat Isomerase (A) und der Coomassie-Färbung (B) eines Rohextraktes sechs Tage alter Roggenkeimlinge (1) und der gereinigten cytoplasmatischen (2) und plastidären (3) Isoenzyme nach Elektrophorese in einem 7,5% Gel. (Methode, vgl. II. 3.7.4).

1.4 Zusammenfassende Darstellung des Reinigungsverfahrens und Reinigungstabelle

Die Tabelle 3 zeigt eine Gesamtübersicht des methodischen Teils zur Präparation reiner Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase.

In Tabelle 4 (und 4a) ist der Reinigungsverlauf an Hand von Zahlenwerten belegt. Tabelle 4 bezieht sich auf eine Präparation der TIM-Isoenzyme aus Blattextrakten von Roggenkeimlingen, die bei 22°C im Dauerlicht angezogen wurden. Die römischen Ziffern I bzw. II stehen für die cytoplasmatischen bzw. plastidären Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase. Da, wie aus der Tabelle 4 zu entnehmen ist, die Ausbeute des plastidären Isoenzyms im Vergleich zum cytoplasmatischen Isoenzym mit 1,4% relativ gering ist, wurden zum Teil auch Präparationen von Roggenkeimlingen, die bei höherer Temperatur angezogen wurden (32°C), durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, daß das plastidäre Isoenzym mit größerer Ausbeute gereinigt werden konnte (3,9%).

Die graphischen Darstellungen sowie die im Text angegebenen Werte beziehen sich nur auf die Präparation der TIM aus Blattextrakten von Keimlingen, die bei 22°C gezogen wurden.

Übersicht über den Ablauf der Reinigung der cytoplasmatischen und plastidären Form der Triosephosphat-Isomerase aus Blattgeweben sechs Tage alter Roggenkeimlinge. Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt.
Puffer 1: 10 mM $NaPO_4$-300 mM Saccharose-20 mM MET-0,5 mM PMSF, pH 8,0
Puffer 2: 25 mM KPO_4-20 mM MET-0,5 mM PMSF, pH 8,6
Puffer 3: 12,5 mM KPO_4-20 mM MET-0,5 mM PMSF, pH 8,6
Puffer 4: 25 mM KPO_4-200 mM KCl-20 mM MET-0,5 mM PMSF, pH 8,6
Puffer 5: 25 mM KPO_4-6M Ammoniumsulfat-20 mM MET-0,5 mM PMSF, pH 7,2
Puffer 6: 50 mM Tris-HCl-20 mM MET, pH 7,5.

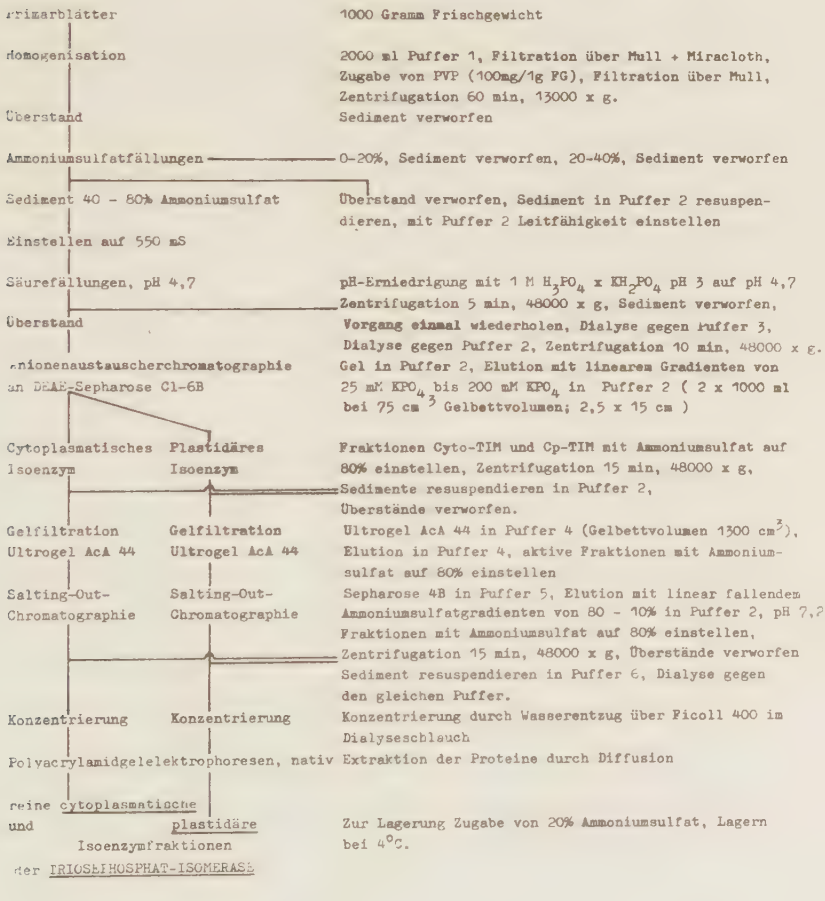


Tabelle 3 :

Schritt		TIM-Aktivität /ukat	Gesamt-protein mg	Spezif. Aktivität /ukat / mg	Ausbeute %	Anreicherung x - fach
Rohextrakt 22°C, Licht		1171,8	22872	0,05	100,0	1,0
Ammoniumsulfatfällung		1156,0	17342	0,07	99,1	1,3
Säurefällung, pH 4,7		1132,1	3417	0,33	97,1	6,5
DEAE-Sepharose Cl-6B	I	449,7	521	0,87	38,6	16,8
	II	420,3	372	1,13	36,0	22,0
Gelfiltration AcA 44	I	469,1	294	1,59	40,2	31,0
	II	401,5	98	4,09	34,4	79,6
Salting-Out-	I	385,8	122	3,16	33,1	61,5
Chromatographie	II	276,6	51	5,47	23,7	106,2
Polyacrylamidgelelek-	I	72,6	3,8	18,92	6,2	368,1
trophorese	II	15,9	0,5	30,27	1,4	588,9

Tabelle 4 : Legende siehe Seite 58

Schritt		TIM-Aktivität /umol x s^{-1}	Gesamt-protein mg	Spezif. Aktivität /ukat/ mg	Ausbeute %	Anreicherung x - fach
Rohextrakt 37°C, Licht		1411,5	14123	0,10	100,0	1,0
Ammoniumsulfatfällung		1112,8	3238	0,34	78,8	3,4
Säurefällung, pH 4,7		1096,6	1746	0,63	77,7	6,3
DEAE-Sepharose Cl-6B	I	372,0	270	1,39	26,4	13,8
	II	288,4	132	2,18	20,4	21,8
Gelfiltration AcA 44	I	515,9	237	2,17	36,5	21,7
	II	374,8	46	8,22	26,6	82,2
Salting-Out-	I	467,6	133	3,50	33,1	35
Chromatographie	II	367,3	35	10,60	26,0	106,0
Polyacrylamidgelelek-	I	15,4	0,5	33,08	1,1	331,0
trophorese, nativ	II	55,3	1,5	36,67	3,9	366,7

Tabelle 4a : Legende siehe Seite 58

2. CHARAKTERISIERUNG DER GEREINIGTEN ISOENZYME

2.1 Isoelektrische Fokussierung

Das vorangegangene Kapitel beschäftigte sich mit den Methoden zur Präparation reiner Proteinfraktionen, die in höheren Konzentrationen für die Charakterisierung und Darstellung der Unterschiede der Triosephosphat Isomerase-Isoenzyme benötigt wurden. TIM-Isoenzyme aus Geweben höherer Pflanzen sind bislang in reiner Form nicht beschrieben worden. Charakterisierungen der multiplen Formen sind aus Erbsenblättern (Anderson, 1971a), höheren und niederen Pflanzen (Bukowiecki und Anderson, 1975) und Euglena gracilis (Mo et al., 1973) durchgeführt worden. Alle Formen der Triosephosphat Isomerase wurden durch isoelektrische Fokussierung getrennt. Ihre isoelektrischen Punkte waren überraschend ähnlich. Die Bestimmung der isoelektrischen Punkte der Isoenzyme der TIM aus Roggen sollte zeigen, ob vergleichbare Werte erhalten werden.

Es ist bekannt, daß die cytoplasmatischen und plastidären Isoenzyme der TIM durch Anionenaustauscherchromatographie und Gelelektrophorese voneinander getrennt werden können. (vgl. 1.2.1 und 1.3). Beide Verfahren trennen nach Ladung auf Wie groß diese Ladungsunterschiede sind, sollte durch isoelektrische Fokussierung, einem weiteren elektrophoretischen Verfahren festgestellt werden. Nach dieser Methode wandern Proteine in einem pH-Gradienten, der durch Trägerampholyte erzeugt wird, solange, bis sie einen pH-Wert erreichen, der ihrem isoelektrischen Punkt entspricht. Am isoelektrischen Punkt verliert das Protein seine Wanderungsfähigkeit, da die Gesamtladung gleich null ist. Dadurch werden Proteine in scharfen Banden fokussiert und konzentriert.

Für die Bestimmung der isoelektrischen Punkte der TIM-

Isoenzyme wurden zwei Verfahren angewandt: 1) Fokussierung in einem Saccharosegradienten auf einer 30 ml IEF Säule bzw. 2) in Agarosegelen. Trotz unterschiedlicher Trennzeiten stimmten die aus beiden Verfahren gewonnenen isoelektrischen Punkte gut überein. Allerdings führte die lange Trennzeit auf der IEF-Säule zu einem 30%igen Aktivitätsverlust. Für das cytoplasmatische Enzym wurden isoelektrische Punkte von pH 4,6 bzw. 4,7 bestimmt. Die Werte für das plastidäre Isoenzym lagen bei pH 4,45 bzw. 4,4 (Abb. 9 und 10). Es wurden jeweils die pH-Werte der Fraktionen mit maximaler Enzymaktivität bestimmt.

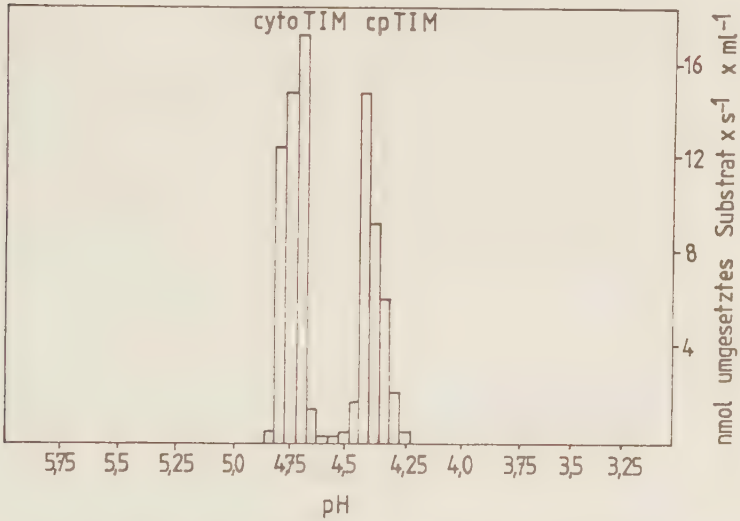


Abb.9: Darstellung der Aktivitätsprofile der Triosephosphat Isomerase-Isoenzyme aus einer mit Ammoniumsulfat zwischen 40-80% gefällten und gut dialysierten Probe nach isoelektrischer Fokussierung in einem 1%igen Agaroseflachgel mit Ampholyten zwischen pH 3 und pH 6. Die Fokussierung wurde bei 4°C für 1,5 Stunden mit 15 Watt (10 mA - 1500 V) durchgeführt.

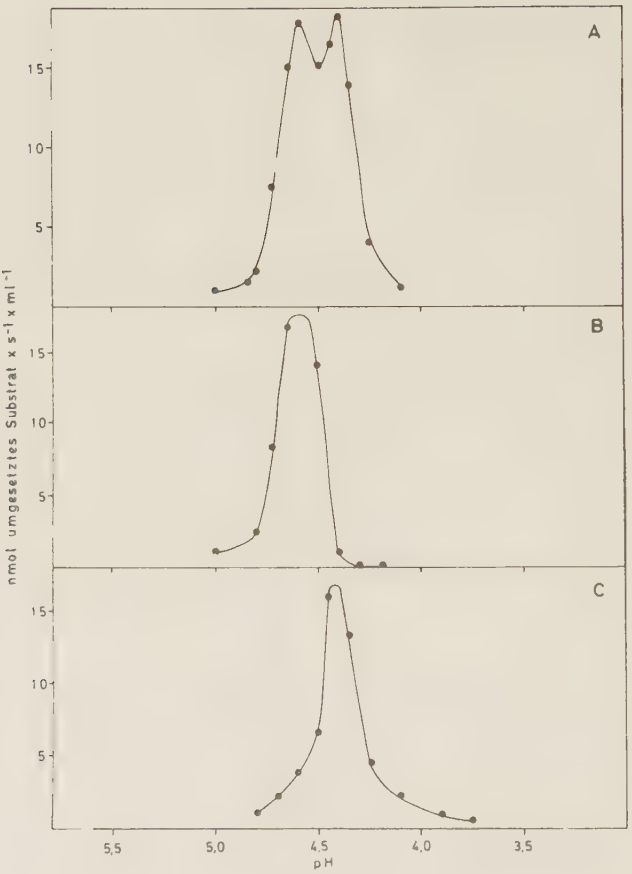


Abb.10: Darstellung der Aktivitätsprofile der Triosephosphat Isomerase nach isoelektrischer Fokussierung eines Rohextraktes aus Primärblättern sechs Tage alter Roggenkeimlinge (A) und der gereinigten und getrennten cytoplasmatischen (B) und plastidären (C) Isoenzyme in einer 30 ml IEF-Säule von ISCO, Modell 212. (Methode siehe II.3.8).

In Tabelle 5 sind die isoelektrischen Punkte der Triosephosphat Isomerase aus Euglena gracilis, Blattgeweben der Erbse und des Roggen vergleichend gegenübergestellt.

Ursprung	Vorkommen Cytoplasma	Chloroplast	Literatur
Euglena gracilis (IEF-Säule)	4,8	4,4	Mo et al., 1973
Erbse, Blatt	4,8	4,75	Anderson, 1971a
(IEF-Säule)	4,75	4,8	Bukowiecki und Anderson, 1975
Roggen, Blatt			Vorliegende
(IEF-Säule)	4,6	4,4	Arbeit, 1981
(Agaroseflachgel)	4,7	4,45	

Tabelle 5: Vergleich der isoelektrischen Punkte der Triosephosphat Isomerase-Isoenzyme aus verschiedenen Organismen.

Die cytoplasmatische Form weist in den unterschiedlichen Organismen einen recht übereinstimmenden isoelektrischen Punkt auf. Die Werte für das plastidäre Isoenzym aus Euglena gracilis und den Blattextrakten des Roggen sind identisch.

2.2 Molekulargewichtsbestimmung

Als weitere Eigenschaft der beiden Formen der Triosephosphat Isomerase aus Roggenblätter wurden die Molekulargewichte bestimmt. Dazu wurden die Methoden der Gelpermea-

tionsfiltration (Andrews, 1965; Gibson und Tabita, 1977), der Sedimentationsgeschwindigkeit (Martin und Ames, 1961) in linearen Saccharosegradienten und der SDS-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) angewandt.

Bei der Gelfiltration wird der Stoke'sche Radius eines Proteinmoleküls bestimmt. Da der Stoke'sche Radius nur unter der Annahme eines vollkommen dehydratisierten Zustands bestimmt werden kann, liefert er mit Vergleichsproteinen bekannten Molekulargewichts nur ungefähre Molekülgrößen. Für die cytoplasmatische Form der Triosephosphat Isomerase wurde ein Molekulargewicht von 53 000 Dalton ermittelt. Für das plastidäre Isoenzym konnten 54 000 Dalton errechnet werden.
Die Bestimmungen wurden auf Ultrogel, einem Mischpolymerisat aus Acrylamid und Agarose durchgeführt, da es bessere Lauf- und Trenneigenschaften aufwies als Sephadexgele, die z.B. von Andrews benutzt wurden.

Weit deutlicher zeigen sich Differenzen in der Molekülgröße der Triosephosphat Isomerase-Isoenzyme bei Zentrifugationen auf Saccharosegradienten nach dem Sedimentationsgeschwindigkeitsverfahren. Aus der Abb. 12 ist zu ersehen, daß sich für das cytoplasmatische Isoenzym ein Molekulargewicht von 50 000 Dalton ergibt, während für die plastidäre Form 54 000 Dalton ermittelt wurden.

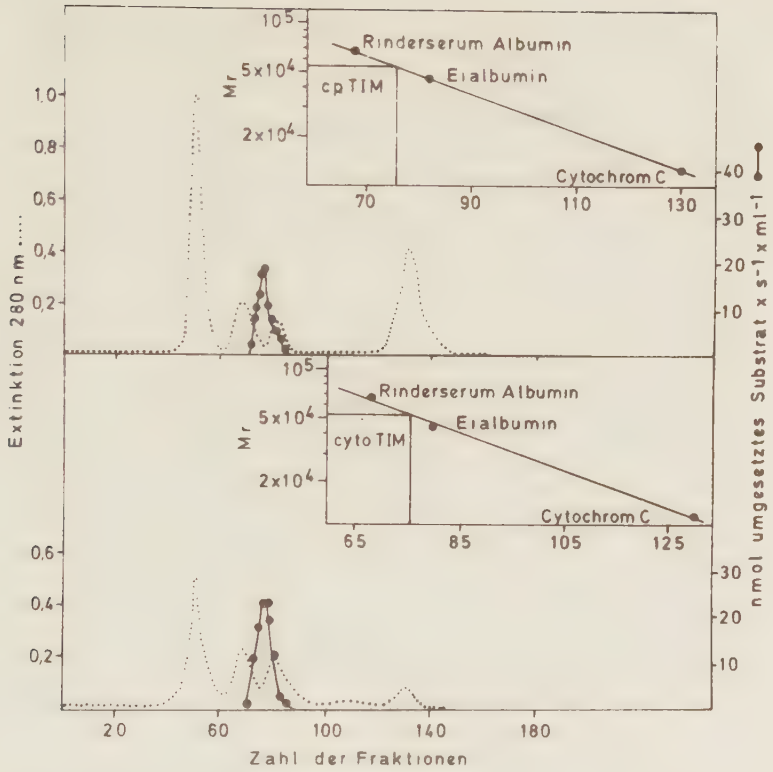


Abb.11: Darstellung der Aktivitätsprofile der Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase (oben: Cp-TIM; unter: Cyto-TIM) und der Elutionsprofile der Eichproteine Rinderserumalbumin (67 KD), Eialbumin (43 KD) und Cytochrom c (12,5 KD) nach Gelfiltration an Ultrogel AcA 44 in 25 mM Kaliumphosphatpuffer - 20 mM MET - 0,5 mM PMSF, pH 7,5. In den Abbildungen ist die semilogarithmische Darstellung der Eichgeraden eingezeichnet.

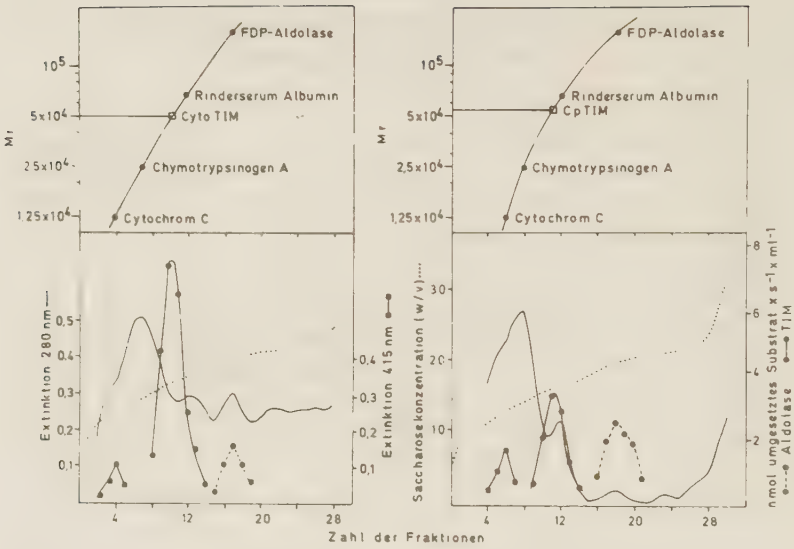


Abb.12: Molekulargewichtsbestimmung der getrennten Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase durch das Sedimentationsgeschwindigkeitsverfahren in linearen Saccharosegradienten (5-20%). Je 100 µl Eichproteine (Cytochrom c, Chymotrypsinogen A, Rinderserumalbumin und FBP-Aldolase (je 1 mg/ml H_2O) wurden mit 100 µl Enzymlösung aufgetragen und 39 h bei 190 000 x g zentrifugiert. Cytochrom c wurde photometrisch bei 415 nm gemessen; Chymotrypsinogen A und Rinderserumalbumin bei 280 nm. Die FBP-Aldolase und Triosephosphat Isomerase wurden enzymatisch bestimmt. Die Werte der Fraktionen mit maximaler Extinktion wurden für die semilogarithmische Darstellung der Molekulargewichte eingesetzt.

Im dritten Verfahren wurden die Molekulargewichte der TIM-Isoenzyme durch SDS-Gelelektrophorese bestimmt. Gelelektrophoresen unter nativen Bedingungen trennen Proteine im elektrischen Feld nach der äußeren Form, der Molekülgröße und der Gesamtnettoladung. Unter dem Einfluß von Laurylsulfat (SDS) und der Denaturierung des Proteins durch hohe Temperaturen (100°C) und Mercaptoäthanol werden die positiven Ladungen durch SDS maskiert und kovalente Bedingungen verschiedener Untereinheiten gelöst. Dabei werden alle Polypeptidketten in eine lang gestreckte Form, die einer Micelle mit einheitlich nach außen gerichteten negativen Ladungen gleicht, überführt. Somit ist für die Wanderung des Proteins während der SDS-Elektrophorese nur das Molekulargewicht maßgeblich. Zwischen der Wanderungsstrecke von Eichproteinen und dem Logarithmus ihrer Molekulargewichte besteht eine lineare Beziehung, die die Erstellung einer Eichgerade ermöglicht. Es wurden sechs verschiedene Vergleichsproteine von bekanntem Molekulargewicht bei der Elektrophorese eingesetzt (vgl. Tabelle 1), mit deren Hilfe dem Polypeptid der cytoplasmatischen Form ein Molekulargewicht von 26,5 $\pm$ 0,5 KD und dem plastidären Protein von 27 $\pm$ 0,5 KD zugeordnet werden konnte.

Da, wie aus Abb. 13 zu ersehen ist, die gereinigten Proteine der Isoenzyme in der SDS-Gelelektrophorese nur ein Polypeptid ergeben, nach Gelfiltration und dem Sedimentationsgeschwindigkeitsverfahren unter nicht-denaturierenden Bedingungen doch doppelt so große Molekulargewichte ermittelt wurden, kann man es als gesichert ansehen, daß die TIM-Isoenzyme aus zwei Untereinheiten mit identischem Molekulargewicht aufgebaut sind. Ob sich die Monomeren jedes Isoenzyms voneinander unterscheiden, kann aus diesem Ergebnis nicht abgeleitet werden.

Eine zusammenfassende Gegenüberstellung der Molekularge-

wichte der Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase aus Roggenblättern zeigt die Tabelle 6.

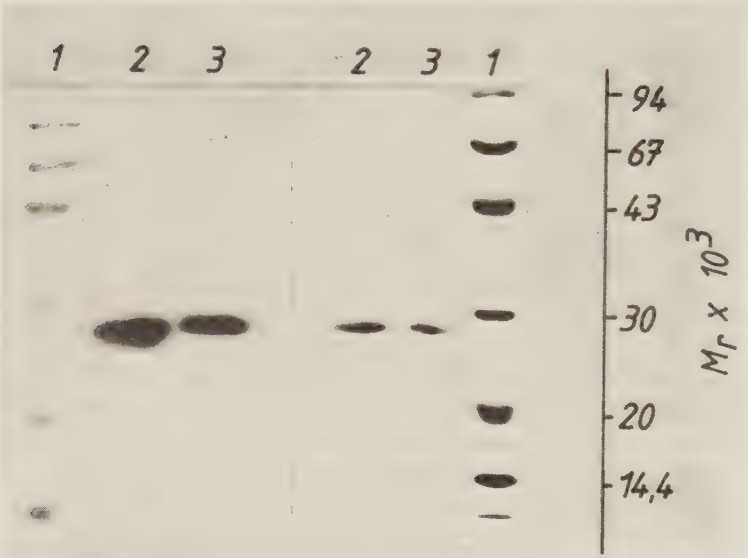


Abb.13: Darstellung der relativen Beweglichkeit der gereinigten Triosephosphat Isomerasen.
1 = Vergleichsproteine als Molekulargewichtsstandard; Phosphorylase B (94 KD); Rinderserumalbumin (67 KD); Eialbumin (43 KD); Carboanhydrase (30 KD); Trypsin-Inhibitor (20 KD); α-Lactalbumin (14,4 KD).
2 = cytoplasmatische Form der Triosephosphat Isomerase
3 = plastidäre Form der Triosephosphat Isomerase.
Die Proteine wurden in einem 10 - 15%igen Gradientengel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. (Methode siehe II.3.6.1).

Methode	Molekulargewicht in KD Cyto TIM	Cp TIM
Gelfiltration auf Ultrogel AcA 44	53,0 ± 2,5	54 ± 2,5
Sedimentationsgeschwindigkeitsverfahren auf linearen Saccharosegradienten (5-20%)	50,0 ± 5,0	54 ± 5,0
SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (10-15%)	26,5 ± 0,5	27 ± 0,5

Tabelle 6: Gegenüberstellung der Molekulargewichte der Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase, die durch Gelfiltration, durch das Sedimentationsgeschwindigkeitsverfahren in Saccharosegradienten und durch SDS-Gelelektrophorese bestimmt wurden.

Aus der Tabelle 7 kann man ersehen, daß die Triosephosphat Isomerase bzw. ihre multiplen Formen in Mikroorganismen, Protophyten, höheren Tieren und Pflanzen ein recht konstantes Molekulargewicht beibehalten haben.

Herkunft	Multiple Formen	Molekulargewicht in KD Dimer	Monomer	Literaturnachweise
Bacillus stearothermophilus	1	55(2)	27(3)	Artavanis-Tsakonas und Harris, 1980
Hefe	1	56(6);53(4a) 54(1);56,9(2)	29,5(4b)	Krietsch et al., 1970 b Noltmann, 1972
Kaninchen:				Krietsch et al., 1971
Muskel	3	56(5);59,5(1) 48-60(4a); 56(6);58,5(2) 53(7);50(4b) 52(7);53(2)	27,3 25(4b) 26,5(3)	Krietsch et al., 1970a,b Noltmann, 1972 Johnson und Waley, 1967 Corran und Waley, 1975
Leber	-	56(6)	----	Krietsch et al., 1970 b
Mensch:				
Muskel	3	57,4(1)	26,5(3) 27,3(3) 28,5(3)	Eber und Krietsch, 1980 Dabrowska et al., 1978
Erythrozyten	3	56,4(4a) 57(4a) 56(4a)	29,1(4b) 28,7(4b) 28,9(4b)	Sawyer et al., 197 Gracy, 1975
Placenta	2	----	26,5(3)	Yuan et al., 1979
Euglena gracilis	2			
Cytoplasma		56(1)	----	Mo et al., 1974
Chloroplasten		60(1)	----	
Winterroggen	2			
Cytoplasma		53(1);50(6)	26,5(3)	Vorliegende Arbeit
Chloroplasten		54(1);54(6)	27(3)	

Tabelle: 7 Vergleich der Molekulargewichte der Triosephosphat-Isomera e formen aus verschiedenen Organismen. Die Molekulargewi te für das native Enzym (Dimer) und für seine Untereinheiten (Monomer) wurden durch verschiedene Methoden bestimmt (. . hinter den Molekulargewichten): 1 = Gelfiltration; 2 = Aminosäuresequenzbestimmung; 3 = SDS-Gelelektrophor . . , 4a,b = Sedimentations-Gleichgewichts-Verfahren, 5 = in . . wart von SDS; 5 = Phenol-Eisessig-H O-Gele; 6 = Sedimentations-Geschwindigkeits-Verfahren; 7 = Röntgenkristallogra . .

2.3 Nachweis von Glykoproteinen

Die Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase aus Roggenkeimlingen wurden als Proteine mit ähnlichen Molekulargewichten und verschiedenen Gesamtnettoladungen bestimmt. Wenn die Zelle zwei Formen eines Enzyms synthetisiert, die, wie Feierabend (1979) zeigen konnte, beide an cytoplasmatischen Ribosomen translatiert werden, so bleibt die Frage nach der Translokation zu klären. Um durch die Chloroplastmembranen zu gelangen, muß die plastidäre Form der TIM Eigenschaften besitzen, die das cytoplasmatische Isoenzym nicht aufweist.

Über Translokationsmöglichkeiten sind bisher viele Hypothesen veröffentlicht worden. Auf eine dieser Möglichkeiten soll in diesem Kapitel eingegangen werden.

Onishi et al. (1979) diskutierten u.a. Transportmöglichkeiten bei Hefeenzymen. Einige der synthetisierten Enzyme werden wie die Carboxypeptidase Y und die alkalische Phosphatase in die Vakuole, andere, z.B. Invertase und saure Phosphatase, an die Außenseite der Zellwand transportiert. Gemeinsam ist beiden Enzymgruppen, daß sie durch eine Membran gelangen müssen, einmal intrazellulär, einmal extrazellulär. Wichtig im Zusammenhang des Transportes der plastidären Form der TIM ist die Tatsache, daß die Hefeenzyme glykosylierte Proteine sind. Sie unterscheiden sich zwar in der Art und dem Grad der Glykosylierung, aber ohne den Kohlenhydratanteil sind sie nicht transportfähig. Untersuchungen mit dem Antibiotikum Tunicamycin, durch das die Bindung des Zuckeranteils an das Protein unterbunden wird, zeigten, daß die nicht-glykosylierten Hefeenzyme Invertase und Carboxypeptidase im Cytoplasma akkumulieren. Die Enzyme kreuzreagieren immunologisch, sind aber unglykosyliert nicht aktiv. Der Kohlenhydratanteil scheint einerseits

in einer nicht näher erläuterten Weise am Transport der Proteine durch die Membranen beteiligt zu sein, andererseits ist er wichtig für die Bildung einer aktiven Konformation des Proteins.

Es wurde daher untersucht, ob sich das plastidäre Isoenzym der TIM von der cytoplasmatischen Form durch eine Glykosylierung unterscheidet.
Es wurden verschiedene Verfahren zur Glykoproteinbestimmung angewendet.

Die Perjodsäure-Schiff-Reaktion wurde in nativen Gelsystemen nach Zacharius et al. (1969) und in denaturierenden Systemen nach Glossman und Neville (1971) und Segrest und Jackson (1972) durchgeführt. In allen Systemen wurden aber unspezifisch auch nicht-kohlenhydrathaltige Proteine wie Rinderserumalbumin, Phosphorylase B, Carboanhydrase mitgefärbt. Bei nicht-denaturierenden Gelen zeigt die plastidäre Form der TIM im "Sammelgel" eine stärker gefärbte Bande auf, die bei Kontrollversuchen ohne Perjodsäureoxidation nicht zu sehen war. Unklar ist dieses Verhalten insofern, als auch nach Proteinfärbung im Sammelgel keine Bande nachgewiesen werden konnte.

Eine empfindliche Methode, Glykoproteine zu erkennen, ist die Kopplung von Dansylhydrazin an Aldehydgruppen proteingebundener Zucker nach Perjodsäureoxidation (Eckhardt et al. 1976). Die entstandenen Hydrazone werden durch Natriumborhydrid zu stabilen Hydrazinen reduziert und können durch Fluoreszenzanregung im UV-Bereich (366 nm) sichtbar gemacht werden. Die Bandenmuster in nativen und denaturierenden Gelen waren nach Färbung auf Glykoproteine identisch mit denen nach Anfärbung auf Protein. Das Auftreten einer stark fluoreszierenden Bande der plastidären Form im Sammelgel wurde

auch nach Dansylhydrazinfärbung beobachtet (Abb.14). Somit konnten beide beschriebenen Methoden für die Glykoproteinbestimmung nicht verwertet werden.

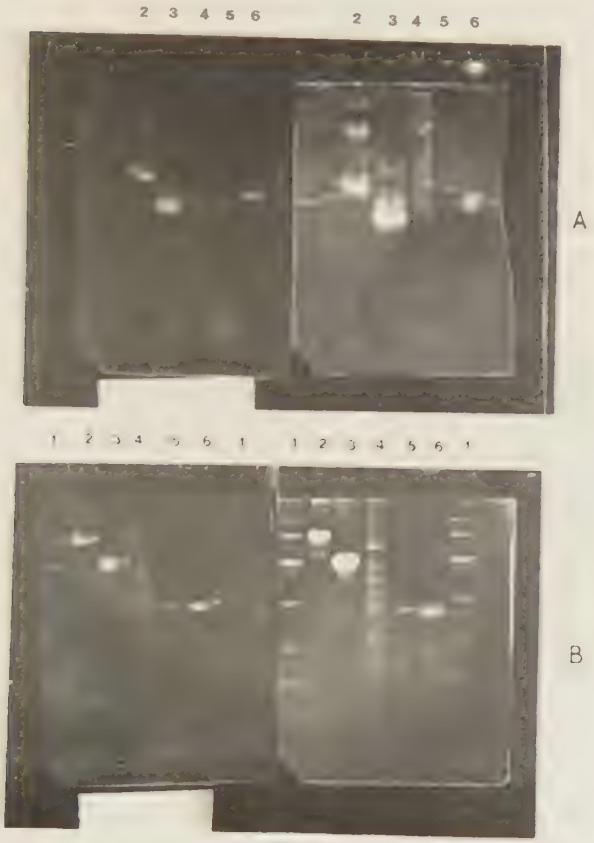


Abb.14: Glykoproteinfärbung mit Dansylhydrazin nach nativer (A) und denaturierender (B) Gelelektrophorese. Die linken Seiten zeigen die Färbung ohne Perjodsäureoxidation. In Spalte 1 sind Eichproteine mit bekannten Molekulargewichten abgebildet. Rinderserumalbumin als nicht-kohlenhydrathaltiges Protein ist in Spalte 2 dargestellt. Die Spalte 3 zeigt das Glykoprotein Eialbumin. Roggenrohextrakt (4) und ge[illegible] cytoplasmatische (5) und plastidäre (6[illegible] zyme der Triosephosphat Isomerase sind di[illegible] suchten Proben.

Eine weitere Möglichkeit Glykoproteine nachzuweisen ist die von Racusen (1979) beschriebene Methode, Furfural-Derivate nach Dehydrierung des Zuckers mit Thymol zu einem quinoidalen Pigmentkomplex zu koppeln, der nach Schwefelsäurebehandlung im Gel rosa gefärbt wird.
Aufgrund einer labilen Komplexbildung konnten nur schwach gefärbte Banden für Eialbumin und das plastidäre Isoenzym nachgewiesen werden. Ein großer Nachteil dieser Färbemethode ist die sehr starke Hintergrundfärbung des Gels. Deshalb lassen sich die Ergebnisse photographisch schlecht dokumentieren (Abb. 15).

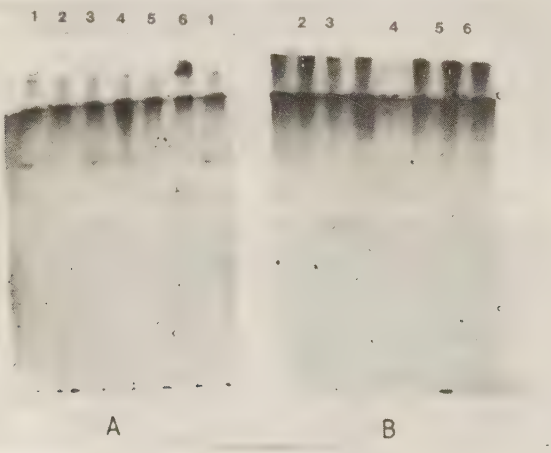


Abb.15: Glykoproteinnachweis mit Thymol-Schwefelsäure-Reagenz nach denaturierender (A) und nativer (B) Gelelektrophorese. Die aufgetragenen Proben sind Eichproteine (1) mit bekanntem Molekulargewicht, nicht-kohlenhydrathaltiges Rinderserumalbumin (2), das Glykoprotein Eialbumin (3), Rohextrakt aus Blattgeweben 6 Tage alter Roggenkeimlinge (4), gereinigte cytoplasmatische (5) und plastidäre (6) Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß das plastidäre Isoenzym der Triosephosphat Isomerase im Gegensatz zur cytoplasmatischen Form ein glykosyliertes Protein zu sein scheint. Die Unzulänglichkeiten der verschiedenen Methoden erschweren eine bestimmtere Aussage.

2.4 Immunologische Charakterisierung

Eine weitere Charakterisierung der Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase ist durch immunologische Untersuchungen möglich. Voraussetzungen dafür sind spezifische Antikörper. Die Bildung von Antikörpern kann durch Injektion eines körperfremden Proteins in z.B. Kaninchen angeregt werden. Antigen-Antikörper-Reaktionen sind außerordentlich spezifisch. Während der Synthese der Antikörper dienen nur bestimmte Oberflächenstrukturen der Proteine als "determinante Gruppen", deren Konfiguration komplementär zu den Bindungsstellen des Antikörpers sind. Leichte Veränderungen in der Struktur des Proteins führen zu neuen spezifischen Antikörpern. Da Proteine normalerweise multivalent immunogen sind, d.h. sie besitzen viele Epitope, wird bei der Injektion eine Vielzahl verschiedener Antikörper synthetisiert.
Durch geeignete Methoden (Einfach-Diffusion, Ouchterlony-Doppeldiffusion, Immunelektrophorese) lassen sich mit den Antikörpern Enzyme nachweisen, die teilweise denaturiert oder gealtert sind und keine katalytische Funktion mehr haben, oder Zymogene, die ihre Funktion noch nicht erfüllen können (Daussant et al., 1977). Antikörper können auch zu qualitativen und quantitativen Analysen eingesetzt werden. Das setzt voraus, daß die Spezifität der Seren bekannt ist.

2.4.1 Spezifität der Antiseren gegen die Formen der Triosephosphat Isomerase

Es wurden Antikörper gegen gereinigte Proteine der Triosephosphat Isomerase-Isoenzyme erzeugt. Zum Nachweis ihrer Spezifität wurden zwei verschiedene Verfahren verwendet.

1) Die Ouchterlony-Doppeldiffusion: Antigen und Antikörper diffundieren in Agarosegelen direkt gegeneinander und präzipitieren zu einem nicht-löslichen Antigen-Antikörper-Komplex.

2) Nachweis löslicher Antigen-Antikörper-Komplexe: Selbst wenn eine Präzipitation ausbleibt, kann bei Enzymen durch die Bindung der Antikörper an das Antigen die Aktivität gehemmt werden.

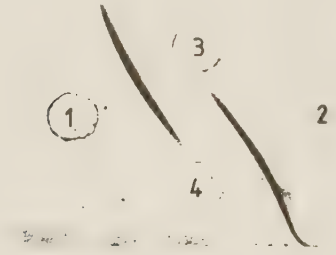


Abb.16: Ouchterlony-Doppeldiffusion gereinigter cytoplasmatischer (1) und plastidärer (2) Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase gegen gereinigte, konzentrierte Antiseren anti-Cyto TIM (3) und anti-Cp TIM (4).
4,8 µg Cyto-TIM und 4,5 µg Cp-TIM diffundierten für 48 Stunden gegen 48 µl anti-Cyto TIM und 16 µl anti-Cp TIM.

Die Ouchterlony Doppeldiffusion zeigt in Abbildung 16 Präzipitationslinien der Antigene mit ihren Antikörpern. Präzipitationen finden dann statt, wenn multivalente Antigene mit den meist bivalenten Antikörpern ein dreidimensionales Netzwerk bilden (Kabat, 1971).
Da die Antiseren mit der jeweils anderen Enzymform nicht kreuzreagieren, kann angenommen werden, daß die Antikörper gegen das cytoplasmatische und plastidäre Isoenzym der TIM für ihr Antigen spezifisch sind, und daß keine zwei Epitope der Proteine gemeinsam sind.

Wenn die gegen verschiedenene Determinanten der Isoenzymproteine gerichteten Antikörper keine präzipitierenden Antigen-Antikörper-Komplexe bilden, so können sie dennoch in löslichen Komplexen vorliegen. Durch die Bindung kann das Enzym in seiner katalytischen Aktivität gehemmt werden. Nach Würzburg (1978) sind zwei Hemmechanismen unter den Begriffen sterische Hinderung und allosterischer Effekt bekannt. Bei der sterischen Hemmung geht durch die Bindung des Antikörpers in der Nähe des aktiven Zentrums die Fähigkeit verloren, Substrate zu binden, während bei der allosterischen Hemmung das Enzym aufgrund einer Konformationsänderung nicht mehr reagieren kann.

Aus Abbildung 17 geht hervor, daß die Antiseren anti-Cyto TIM bzw. anti-Cp TIM jeweils nur mit ihrem Antigen, der cytoplasmatischen bzw. der plastidären Form reagieren. Einen Einfluß der Antikörper auf die Aktivität des anderen Proteins, das nicht Antigen ist, kann daher ausgeschlossen werden. In bezug auf die Oberflächenstruktur müssen sich daher die Isoenzyme der TIM deutlich unterscheiden. Kreuzreaktionen sind nach Prager und Wilson (1971) generell für Proteine nicht möglich, wenn die Aminosäuresequenzunterschiede mehr als 40% betragen. Daß die Unterschiede in der Primärstruktur noch kleiner

sein können, beschreiben Kiltz et al. (1977) für die Isoenzyme M_4 und H_4 der Lactat Dehydrogenase des Schweins, die keine immunologischen Kreuzreaktionen aufweisen. Nach Sequenzierung wurden 75% der Aminosäuren in gleichen Positionen gefunden. Eine direkte Aussage über Unterschiede in der Struktur der untersuchten Proteine durch immunologische Methoden kann somit nur einschränkend und unter Anwendung anderer zusätzlicher Verfahren gemacht werden.

Die Ergebnisse mit Antiseren gegen die TIM-Isoenzyme veranschaulichen die Tatsache, daß Unterschiede in den Strukturen vorliegen, nicht aber, welchen Ausmaßes sie sind. Die Antikörper können aufgrund ihrer Spezifität jedoch zu weiteren Untersuchungen eingesetzt werden.

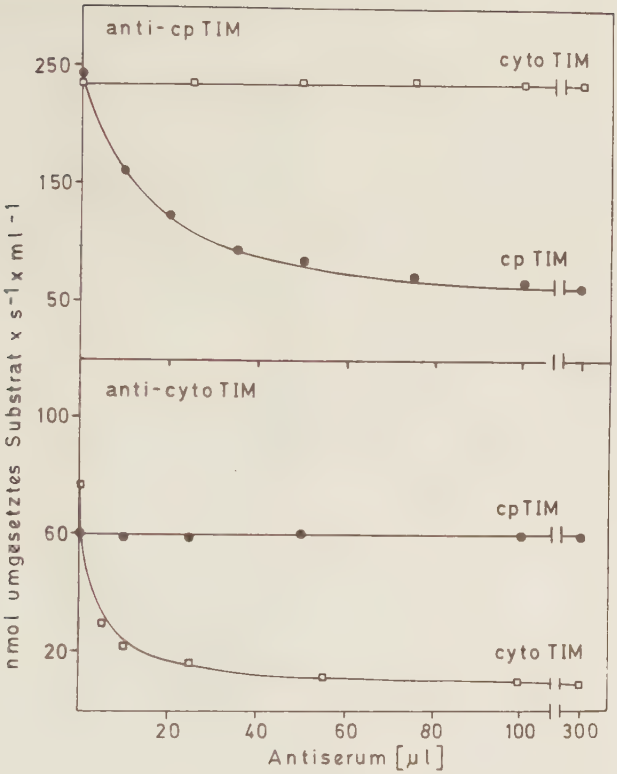


Abb.17: Einfluß steigender Mengen konzentrierter Antiseren (µl/ml Enzymtest) auf die Aktivitäten der plastidären (oben) und cytoplasmatischen (unten) Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase. Die Enzymkonzentration wurde konstant gehalten. Vor dem Start der Reaktion wurde 6 min bei 25°C ohne Substrat vorinkubiert.

2.4.2 Vergleichende Immunelektrophoresen und Spezifität der Antiseren

Aufgrund der Spezifität der Antiseren gegen die TIM-Isoenzyme können sie zu vergleichenden Untersuchungen herangezogen werden. Nach elektrophoretischer Auftrennung von Enzymlösungen, die durch säulenchromatographische Verfahren erhalten wurde, konnten die Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase mit den Methoden der Immunelektrophorese und der gekreuzten Immunelektrophorese identifiziert werden.

Die Ergebnisse in Abb. 18 zeigen, daß ein Blattextrakt aus Roggenkeimlingen, der gegen beide Antiseren diffundierte (Abb. 18/2) zwei Präzipitationslinien bildet, die denen der beiden Isoenzyme entsprechen, während die getrennten Isoenzyme der TIM jeweils nur mit dem gegen sie gerichteten Antiserum reagieren.

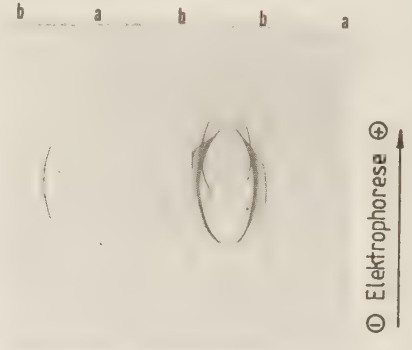


Abb.18: Immunelektrophorese von Blattextrakten sechs Tage alter Roggenkeimlinge (2), die bei 22°C im Dauerlicht gezogen wurden, und den gereinigten cytoplasmatischen (4) und plastidären (1) Isoenzymen, sowie von vorgereinigtem, plastidären Isoenzym (3). Nach 3 stündiger Elektrophorese wurden die Tröge ausgehoben und mit den Antiseren anti-Cyto TIM (a) und anti-Cp TIM (b) gefüllt. Die Diffusion erfolgte für 48 Stunden bei 4°C. (Methode siehe II.5.6, Erläuterung siehe Text.)

Abb.19:
Gekreuzte Immunelektrophorese gereinigter cytoplasmatischer (A) und plastidärer (C) Isoenzyme, sowie von vorgereinigtem plastidären Isoenzym der Triosephosphat Isomerase (D). In der ersten Dimension wurden die Proteinfraktionen elektrophoretisch aufgetrennt. In der zweiten Dimension wurden die Proteine gegen die konzentrierten und vorgereinigten Antiseren anti-Cyto TIM (A; 5%) und anti-Cp TIM (C und D;2,5%) elektrofokussiert. Die Elektrophorese wurde für 18 Stunden bei 10 mA pro Gel in der Kälte durchgeführt. B zeigt die Lokalisation der Proteine der Triosephosphat Isomerase nach der Trennung in der ersten Dimension nach einer Aktivitätsfärbung. Methode siehe II.5.7, Erläuterung siehe Text.

In Abbildung 19 wurde die Diffusion durch eine Elektrophorese ersetzt, die senkrecht zur Laufrichtung der ersten elektrophoretischen Auftrennung durchgeführt wurde. In dem Maße, in dem die Antigene durch das Antiserum-haltige Agarosegel wanderten und mit den Antikörpern reagierten, entstanden Präzipitationsbögen.
In den Abb. 18/3 und Abb. 19/D treten bei vorgereinigten Fraktionen der plastidären Form der TIM nicht nur eine, sondern zwei Präzipitationslinien bzw. -bögen auf. Das Antiserum anti-Cp TIM enthält demnach zusätzliche Antikörper gegen ein schneller wanderndes Protein. Da sich die Linien bzw. Bögen schneiden, ist die Aussage berechtigt, daß es sich um ein Fremdprotein handelt und nicht um ein Spaltprodukt des plastidären Isoenzyms; d.h., dieses Antiserum ist nicht monospezifisch.

Präzipitationen sind abhängig von der Menge des vorliegenden Antigens. Somit ist es nicht verwunderlich, daß im Rohextrakt diese zweite Präzipitation nicht erscheint. Erst im Verlauf der Anreicherung des plastidären Isoenzyms treten diese Präzipitationslinien bzw. -bögen auf. Im Falle des plastidären Isoenzyms konnte das Antiserum auch als Kontrolle für den Reinheitszustand der Enzymlösung eingesetzt werden. In den Abb. 18/1 und 19/C ist bei dem plastidären Isoenzym nur noch eine Linie bzw. ein Bogen zu erkennen. Daraus ist zu schließen, daß die Verunreinigung aus der Enzymlösung entfernt wurde.

Aus den Ergebnissen der vergleichenden Immunelektrophoresen geht hervor, daß für weitere Untersuchungen monospezifische Antiseren gegen das cytoplasmatische Isoenzym der TIM vorliegen und für das plastidäre Isoenzym Antiseren, die zwar mit einem Fremdprotein, nicht aber mit der cytoplasmatischen Form der Triosephosphat Isomerase reagieren.

2.5 Vergleich der Polypeptide nach partieller Hydrolyse

Zur Charakterisierung der Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase aus Roggenblättern kann bisher gesagt werden, daß sich die Proteine in ihren Oberflächenstrukturen und Ladungszuständen unterscheiden. Das eingesetzte Verfahren der isoelektrischen Fokussierung läßt den Schluß zu, daß Differenzen in der Aminosäuresequenz der beiden Isoenzyme bestehen.

Um Unterschiede in der Primärstruktur nachzuweisen, bietet sich eine Sequenzierung an, die aber unter den gegebenen Bedingungen nicht durchführbar war. Eine andere, weit schnellere Methode, Unterschiede aufzuzeigen, ist das Verfahren, Polypeptidketten mit chemischen oder biologischen Mitteln zu hydrolysieren und die Bruchstücke zu trennen und miteinander zu vergleichen. Da Proteine an definierten Stellen, d.h. hinter bestimmten Aminosäuren, partiell oder selektiv gespalten werden können, ist die Wahl des Mittels entscheidend, das spezifisch auf die Struktur des Proteins reagiert. Das bekannteste und meist verbreitete Verfahren ist die Proteolyse mit Trypsin, das hinter den Carbonylfunktionen der Aminosäuren Arginin und Lysin spaltet. Trypsin wird häufig für die "Fingerprint"-Technik eingesetzt, bei der die entstehenden Peptide zweidimensional auf Dünnschichtplatten getrennt und verglichen werden können. Eleganter ist die von Cleveland et al. (1977) entwickelte Methode, Proteine während einer Elektrophorese zu hydrolysieren, und sofort anschließend die Spaltstücke nach ihren apparenten Molekulargewichten aufzutrennen. Besonders vorteilhaft ist, daß die Proteolyse mit relativ geringen Proteinkonzentrationen durchgeführt werden kann. Weiterhin kann man mehrere Proben gleichzeitig verdauen und die Bruchstücke vergleichen.

Partielle Hydrolysen der cytoplasmatischen und plastidären Formen der Triosephosphat Isomerase wurden mit den Proteasen Papain und Staphylococcus aureus V8 und mit Bromcyan durchgeführt. Versuche, die Polypeptide mit Trypsin zu spalten, schlugen fehl, da möglicherweise durch die Probengewinnung Restmengen an SDS vorhanden waren, und Trypsin nach Ma et al. (1980) durch SDS während der ersten Minute bereits inaktiviert wurde.

Eine besondere Rolle unter den Aminosäuren spielt Methionin. Methionin wird vergleichsweise wenig in Protein eingebaut. Das chemische Reagenz Bromcyan spaltet spezifisch unter leicht sauren Bedingungen die Carbonylfunktion des Methionins, wodurch ein Homoserinlacton gebildet wird (Gross, 1967). Die Hydrolyse der Polypeptide der Triosephosphat Isomerase mit Bromcyan wurde nach Nikodem und Fresco (1979) durchgeführt und die Fragmente anschließend eindimensional in SDS-Gelen aufgetrennt. Die Abbildungen 20 und 21 zeigen erwartungsgemäß wenige Bruchstücke. In den Spalten 2 (Cyto-TIM) und 3 (Cp-TIM) sind die Untereinheiten der Triosephosphat Isomerasen als Kontrollen vor der Hydrolyse dargestellt. Bei der plastidären Form haben sich durch die Vorbehandlung (vgl. Methoden) Aggregate mit den apparenten Molekulargewichten 55 000, 82 000 und 104 000 Dalton gebildet. Die nachfolgenden Spalten (4-9) zeigen alternierend die entstandenen Peptide der Isoenzyme. Trotz unterschiedlicher Inkubationszeiten (zwischen 5 Minuten und 3 Stunden) sind qualitativ die gleichen Muster für jedes Isoenzym entstanden. Da eine deutliche Intensitätszunahme aller Fragmente zu sehen ist, nicht aber ein anderes Muster, ist eine sukzessive Spaltung durch Bromcyan beinahe auszuschließen. Für das cytoplasmatische Isoenzym wurden in allen Versuchen 4 Fragmente (Abb 20, Spalte 4, 6, 8; Abb. 21, Spalte 1) durch Coomassie-Färbung nachgewiesen, während es nur 3 Peptide bei der plastidären Form sind (Abb. 20, Spalte 5, 7, 9; Abb. 21, Spalte 2).

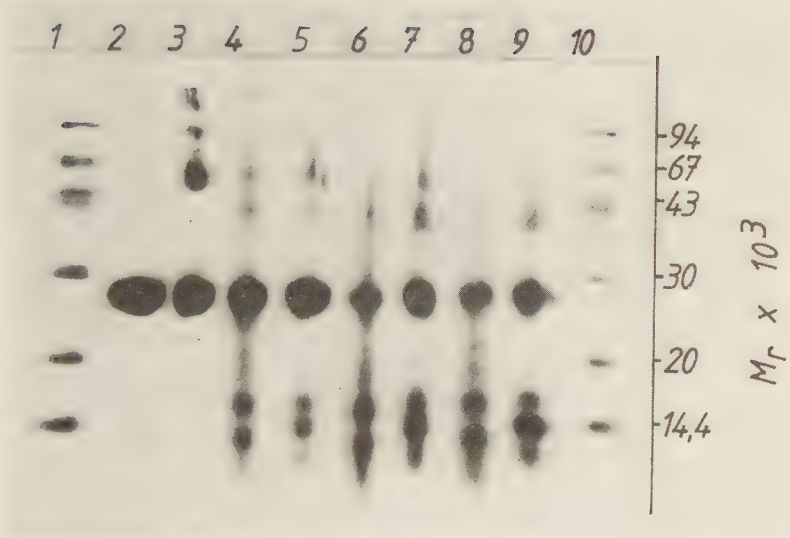


Abb. 20: SDS-Gelelektrophorese von Fragmenten der cytoplasmatischen (4, 6, 8) und plastidären (5, 7, 9) Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase nach Hydrolyse mit Bromcyan. In den Spalten 2 und 3 sind unverdaute Proben der cytoplasmatischen (2) und plastidären (3) Form dargestellt. Die Inkubationszeiten der Hydrolyse betrugen 5 Minuten (4,5), 30 Minuten (6,7) und 180 Minuten (8,9). Als Eichproteine wurden Phosphorylase B (94 KD); Rinderserumalbumin (67 KD); Eialbumin (43 KD); Carboanhydrase (30 KD); Trypsin-Inhibitor (20 KD); und α-Lactalbumin (14,4 KD) in Spalten 1 und 10 dargestellt.

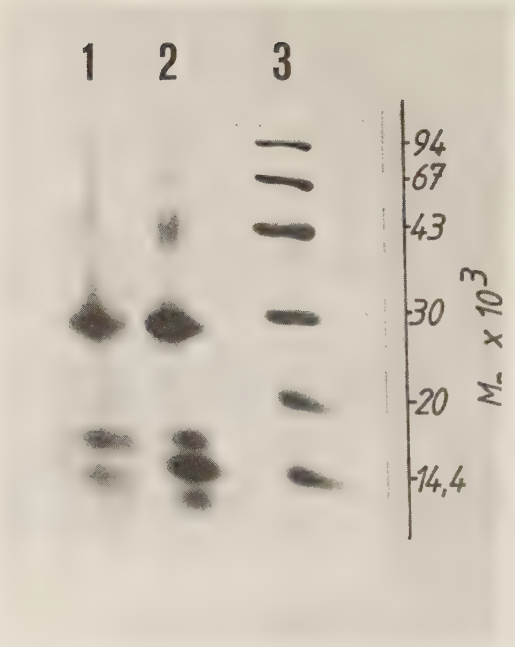


Abb. 21: Darstellung von Fragmenten der Untereinheiten der cytoplasmatischen (1) und plastidären (2) Triosephosphat Isomerase-Isoenzyme nach 60minütiger Hydrolyse durch Bromcyan. Die Fragmente wurden in 15-20%igen SDS-Gelen aufgetrennt. Als Eichproteine (3) wurden Phosphorylase B (94 KD); Rinderserumalbumin (67 KD); Eialbumin (43 KD); Carboanhydrase (30 KD); Trypsin-Inhibitor (20 KD) und α-Lactalbumin (14,4 KD) verwendet. (Methode siehe II.3.7.7.1.)

Ein Densitogramm (Abb. 22) zeigt die Mengenverhältnisse der Fragmente nach 3 Stunden Verdauung in Vergleich zu unverdauten Isoenzymproteinen.

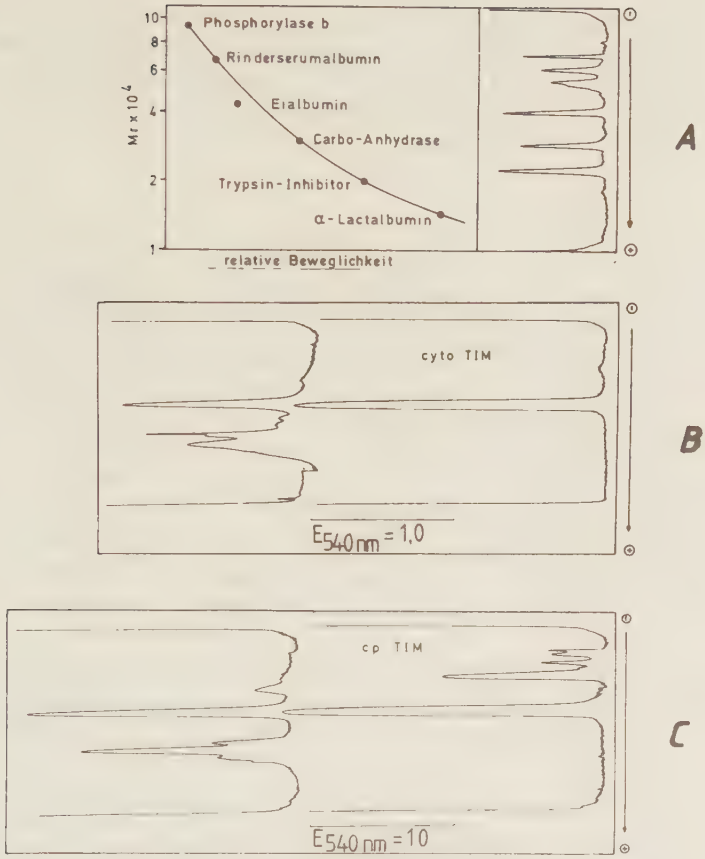


Abb.22: Densitogramme der durch Bromcyan gespaltenen Peptide des cytoplasmatischen (B, links) und plastidären (C, links) Isoenzyms der Triosephosphat Isomerase im Vergleich zu den unbehandelten Untereinheiten der Isoenzyme (B, rechts und C, rechts) aus der Abbildung 20, Spalte 2, 3 und 8, 9. Abb.22 A stellt das Densitogramm der Eichproteine und die semilogarithmische Auftragung der Molekulargewichte dar.

Bei der plastidären Form konnte das mittlere der drei Bruchstücke als doppelt konzentrierte Bande identifiziert werden (Abb. 22, C). Die apparenten Molekulargewichte der Fragmente sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Bromcyan			
Bild 20	Bild 21	Bild 20	Bild 21
Cyto-TIM		Cp-TIM	
28 000	28 000	28 000	28 000
22 000	22 000		
19 500	19 500		
		17 400	17 000
16 800	16 500		
		15 200	15 000
14 200	13 600	13 200	12 800

Tab. 8: Molekulargewichte der Fragmente der cytoplasmatischen und plastidären Triosephosphat Isomerase nach Hydrolyse durch Bromcyan.

Aus der Anzahl der Bruchstücke kann man entnehmen, daß die cytoplasmatische Triosephosphat Isomerase mindestens 3 Methioninreste und die plastidären Untereinheiten mindestens 2 Reste enthalten. Offen ist dabei, ob noch ein Starter-Methionin vorhanden ist. Die Größen der Fragmente geben Hinweise auf die Lage der Methioninreste im Molekül. Nach den Peptiden mit 17 000, 15 000 und 13 000 Dalton zu schließen sind die Methioninreste nahe der Mitte des plastidären Isoenzyms angeordnet, während für die cytoplasmatische Form eine breitere Verteilung über das gesamte Molekül wahrscheinlicher ist, wie die Frag-

mente von 22 000, 19 500, 16 800 und 14 200 belegen. Die Summe der Molekulargewichte der eventuell korrespondierenden Peptide ist etwas größer als die Untereinheiten der Isoenzyme mit 28 000 Dalton. Das beruht nach Reynolds und Tanford (1970) auf den größeren Bindungseigenschaften der Bruchstücke zu SDS.

Die Fragmente mit 13 000 und 17 000 Dalton und das zweifach konzentrierte Bruchstück mit 15 000 Dalton lassen darauf schließen, daß die Cp-TIM möglicherweise aus zwei verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt ist. Setzt man voraus, daß eine sukzessive Spaltung durch Bromcyan ausgeschlossen ist, so müssen zwei Untereinheiten mit je 1 Methionin und gleichem Molekulargewicht vorhanden sein. Schließt man die sukzessive Spaltung nicht aus, so könnten durch zufällige Spaltung bei 17 000 Dalton zwei Peptide mit 17 000 und 13 000 Dalton entstehen, und anschließend von dem 17 000 Dalton-Peptid 2 000 Dalton abgetrennt worden sein, die zu Fragmenten der Größe 15 000 Dalton führen und akkumulieren.

Schwieriger ist die Zuordnung der Fragmente bei der cytoplasmatischen Form der Triosephosphat Isomerase. Ein Methionin liegt sehr wahrscheinlich bei 13 900 Dalton, wodurch Fragmente mit 16 650 und 13 900 Dalton entstehen. Beide Bruchstücke werden mit Coomassie quantitativ angefärbt. Zwei weitere Bruchstücke mit 22 000 und 19 500 Dalton sind sehr schwach angefärbt. Sie sind demnach in bedeutend geringeren Konzentrationen vorhanden als die Fragmente mit 16 650 und 13 900 Dalton. Wenn man wiederum eine sukzessive Spaltung nicht ausschließt, so könnten zuerst die Fragmente bei 22 000 Dalton entstehen, gefolgt von 19 500 Dalton, 16 650 Dalton und dem restlichen Fragment von 13 900 Dalton. Die bei der Entstehung der großen Fragmente gebildeten kleineren Spaltprodukte von 8 000 und 3 500 Dalton sind

wegen des nicht ausreichenden Auflösungsvermögens des Gels nicht nachweisbar. Bei nicht sukzessiver Spaltung müßten die Methioninreste auf verschiedenen Untereinheiten der cytoplasmatischen Form der Triosephosphat Isomerase vorliegen.

Die Ergebnisse der Hydrolyse mit Bromcyan zeigen einen Unterschied der cytoplasmatischen und plastidären Form der Triosephosphat Isomerase in bezug auf die Anzahl der Methioninreste und geben Hinweise, daß die Positionen in den Molekülen verschieden sind.

Ein Vergleich des Methioningehalts der Untereinheiten der Triosephosphat Isomerase aus verschiedenen Organismen zeigt Tabelle 9. Daraus geht hervor, daß die Untereinheiten nicht einheitlich als identisch oder nichtidentisch beschrieben werden.Die Anzahl an Methioninresten liegt bei 1 oder 5 pro Untereinheit für niedere Organismen (Hefe und Bacillus) und auch für die Chloroplasten aus Roggen. Die Polypeptide der cytoplasmatischen Form von Vertebraten (Mensch und Kaninchen) und höheren Pflanzen (Roggen) dagegen scheinen übereinstimmend mindestens 2 Methioninreste zu enthalten.

Methioningehalt der Triosephosphat-Isomerase-Untereinheiten verschiedener Organismen

Ursprung	Methionin-Reste	Untereinheiten	Nachweisverfahren	Literaturnachweis
Bacillus stearothermophilus	5	UE_i	Aminosäuresequenzanalyse	Artavanis-Tsakonas und Harris, 1980
Hefe	1	UE_{n-i}	Aminosäureanalyse	Krietsch et al., 1970 b
Kaninchen				
Leber und	2,5	UE_{n-d}		
Muskel	2,5			
Kaninchen				
Muskel	2	UE_i	Aminosäuresequenzanalyse	Corran und Waley, 1973 , 1975
Mensch				
Placenta	2	UE_{n-i}	Dünnschichtchromatographie nach CNBr-Spaltung	Yuan et al., 1979
Erythrozyten	2	UE_{n-i}	Dünnschichtchromatographie nach Trypsin Verdauung	Sawyer et al., 1978
Roggen				
Cyto-TIM	1-3	UE_{n-d}	Polyacrylamidgelelektrophorese nach CNBr-Spaltung	Vorliegende Arbeit
Cp-TIM	1	UE_{n-d}		

Tabelle 9: Vergleich des Methioningehalts der Untereinheiten der Triosephosphat Isomerase-Formen aus verschiedenen Organismen. Abkürzungen: UE = Untereinheit, CNBr = Bromcyan, Cyto-TIM = cytoplasmatische Form der Triosephosphat Isomerase, Cp-TIM = plastidäre Form der Triosephosphat Isomerase. Indizes: i = identische Untereinheit; n-i = nicht identische Untereinheit; n-d = nicht bestimmt.

Nach der Hydrolyse der Isoenzymproteine durch das chemische Reagenz Bromcyan sollten Unterschiede in den Proteinstrukturen der multiplen Formen der Triosephosphat Isomerase durch hydrolytische Spaltung mit den Proteasen Papain und V8 aus Staphylococcus aureus nachgewiesen werden. Da die Enzyme andere Peptidbindungen als die der Methionylfunktion spalten, ergeben sich andere vergleichbare Peptidmuster. Die Wirkungsspezifität der Protease Papain ist nach Arnon (1971) sehr breit. Es werden aber bevorzugt Peptidbindungen hinter den Aminosäuren Arginin und Lysin und der zweiten Carbonylgruppe nach Phenylalanin gelöst. Da diese drei Aminosäuren zu einem hohen Prozentsatz in Proteinen vorkommen, gibt es viele Ansatzstellen für hydrolytische Spaltungen. Man kann also eine große Anzahl von Bruchstücken erwarten.

Bei der Untersuchung der Triosephosphat Isomerase-Isoenzyme wurden native Enzyme durch Papain hydrolysiert, nachdem bislang denaturierte Proben gar keine oder totale Hydrolyse zur Folge hatten, und eine Auswertung unmöglich war.

Bei der Auswertung der Hydrolyse der Triosephosphat Isomerase-Isoenzyme mit Papain muß berücksichtigt werden, daß es sich um ein Einzelbild handelt, und die optimalen Bedingungen noch nicht gefunden wurden (Abb. 23). Trotzdem sind in den Peptidmustern signifikante Unterschiede feststellbar. Ein Vergleich der Molekulargewichte der Fragmente (vgl. Tab. 10) zeigt, daß kaum Gemeinsamkeiten zwischen den Peptiden der cytoplasmatischen und plastidären Form der Triosephosphat Isomerase vorliegen.
Besonders auffällig ist im niedermolekularen Bereich eine starke Anreicherung von Bruchstücken, die nur noch verwaschen in Erscheinung treten. Das bestätigt die relative Häufigkeit der drei Aminosäuren Arginin, Lysin und

Phenylalanin und die große proteolytische Wirkung des Papains.

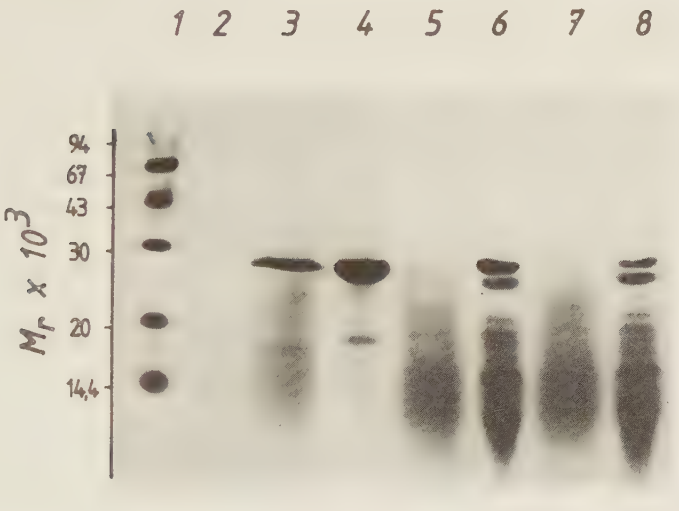


Abb.23: SDS-Gelelektrophorese von Fragmenten der cytoplasmatischen (5,7) und plastidären (6,8) Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase nach partieller Hydrolyse mit der Protease Papain. In den Spalten 3 und 4 sind die unverdauten Proteine der Isoenzyme dargestellt. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten. Es wurde mit 0,5 µg (5,6) und 1 µg (7,8) Papain hydrolysiert. Als Eichproteine (1) wurden Phosphorylase B (94 KD), Rinderserumalbumin (67 KD); Eialbumin (43 KD); Carboanhydrase (30 KD); Trypsin-Inhibitor (20 KD) und α-Lactalbumin (14,4 KD) verwendet. Die Spalte 2 zeigt die Protease Papain (0,5 µg) (Methode siehe II.3.7.7.2)

Ein deutlicher Unterschied zwischen den Triosephosphat Isomerase-Isoenzymen zeigt sich in der Geschwindigkeit des Abbaus. Während das cytoplasmatische Isoenzym nach 30 Minuten mit nur 0,5 µg Papain annähernd vollständig hydrolysiert war, lagen noch unverdaute Untereinheiten der plastidären Form trotz doppelter Proteasekonzentration vor. Das plastidäre Isoenzym scheint weniger empfindlich gegenüber einer Hydrolyse mit Papain zu sein. Die apparenten Molekulargewichte der Fragmente der Triosephosphat Isomerase-Isoenzyme nach Hydrolyse durch Papain sind in Tabelle 10 zusammengefaßt.

Papain	
Cyto TIM	Cp TIM
27 000	25 000
21 000	18 200
17 500	17 000
13 800	15 800
12 500	14 000
11 300	13 500
	8 500

Tabelle 10: Zusammenfassende Darstellung der apparenten Molekulargewichte der Fragmente der cytoplasmatischen und plastidären Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase nach 30-minütiger Hydrolyse mit Papain.

Die Verschiedenheit der Verdauungsmuster bestätigt trotz suboptimaler Bedingungen der Hydrolyse, daß die Triosephosphat Isomerase-Isoenzyme zwei distinkte Proteine sind.

Als weitere Methode zur Charakterisierung von Differenzen in den Peptidketten der cytoplasmatischen und plasti-

dären Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase wurde die Hydrolyse mit der V8-Protease aus Staphylococcus aureus angewendet. V8-Protease wird als extrazelluläre Protease synthetisiert. Sie wurde von Drapeau et al. (1972) isoliert, gereinigt und charakterisiert. Die Autoren beschreiben die Protease als spezifisch für Spaltung der Carboxylgruppen von Aspartat und Glutamat unter Anwesenheit von Phosphatpuffer pH 7,8. Wird jedoch der Hydrolysepuffer verändert, so kann die Wirkung auf die Aminosäure Glutamat eingeschränkt werden. Houmard und Drapeau (1972) nennen Ammoniumbikarbonat-Puffer pH 7,8 und Ammoniumacetat-Puffer pH 4,0.

Der Ammoniumacetatpuffer pH 4,0 wurde zur Proteolyse wegen der niedrigen H^+-Konzentration nicht eingesetzt, da die Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase irreversibel ausfielen. Auch Ammoniumcarbonat konnte als Puffer nicht verwendet werden, da die Isoenzyme nicht mehr in ihre Untereinheiten dissoziierten. Versuche, durch 2%tiges SDS und längerer Temperatureinwirkung sowie durch 8 M Harnstoff die Monomeren der Triosephosphat Isomerase-Isoenzyme zu erhalten, schlugen fehl. Bei der Proteolyse durch V8-Proteasé mußte somit auf die Nutzung einer möglichen Monospezifität gegenüber Glutamat und der daraus resultierenden geringeren Anzahl von Fragmenten verzichtet werden. Die nachfolgend beschriebenen Versuche wurden mit Proben durchgeführt, die in Tris-HCl pH 7,5 vorinkubiert waren. Zwei verschiedene Verdauungsverfahren wurden durchgeführt. Nach Cleveland et al. (1977) wurden gelelektrophoretisch gereinigte, native Proben der cytoplasmatischen und plastidären Triosephosphat Isomerase-Isoenzyme mit Probenpuffer versetzt, der 0,5% SDS und 10% Glycerin enthielt, und in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Protease wurde in 10% Glycerin-haltigem Puffer darübergeschichtet. Protein und Protease wurden durch Anlegen der Spannung gesammelt, und die Hydrolyse durch Abschalten des Stroms für 30

Minuten gestartet. Die Fragmente wurden in einem 15-20%tigen Gradientengel nach Laemmli (1970) für 15 Stunden aufgetrennt (Abb. 24).

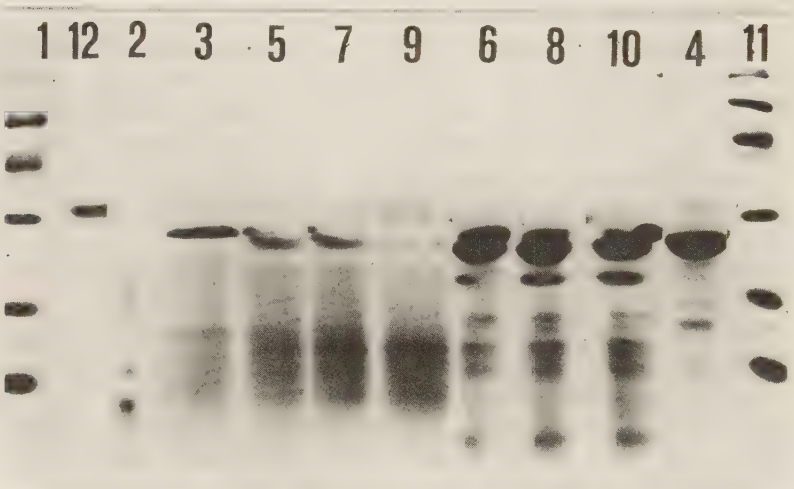


Abb. 24: SDS-Gelelektrophorese von Fragmenten der cytoplasmatischen (5, 7, 9) und plastidären (6, 8, 10) Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase aus grünen Roggenblättern. Die unverdauten Polypeptide sind in Spalte 3 (Cyto-TIM) und Spalte 4 (Cp-TIM) dargestellt. Die Proteolyse wurde mit 0,5 /ug (5, 6), 1 /ug (7, 8) und 5 /ug (9, 10) V8-Protease aus Staphylococcus aureus während der Elektrophorese durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten. Als Eichproteine mit bekannten Molekulargewichten sind in den Spalten 1 und 11 Phosphorylase B (94 KD); Rinderserumalbumin (67 KD); Eialbumin (43 KD); Carboanhydrase (30 KD); Trypsin-Inhibitor (20 KD) und α-Lactalbumin verwendet worden. Die Spalten 2 und 12 zeigen 0,5 bzw. 5 /ug Protease V8. (Methode siehe II.3.7.7.2).

Bei der zweiten angewandten Methode wurden denaturierte Proteine in SDS-haltigen Gelstückchen hydrolysiert, die nach der elektrophoretischen Trennung durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht und aus dem Gel herausgetrennt wurden. Es hat sich bei den Versuchen als vorteilhaft erwiesen, die Gelstücke vor der Verdauung zu zerkleinern und mit Probenpuffer nach Cleveland et al. (1977) zu inkubieren. Der gesammte Ansatz (Gel, Puffer, Protease) wurde in die Taschen des Sammelgels übertragen. Die Auftrennung der Fragmente dauerte etwa 15 Stunden (Abb. 25 und 26). Besonders auffällig ist in den Abbildungen 24, 25 und 26, daß die Polypeptide der cytoplasmatischen Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase weit schneller hydrolysiert wurden, als die der plastidären Form. Dieser Befund wurde auch schon bei der Spaltung der Proteine durch Papain deutlich.

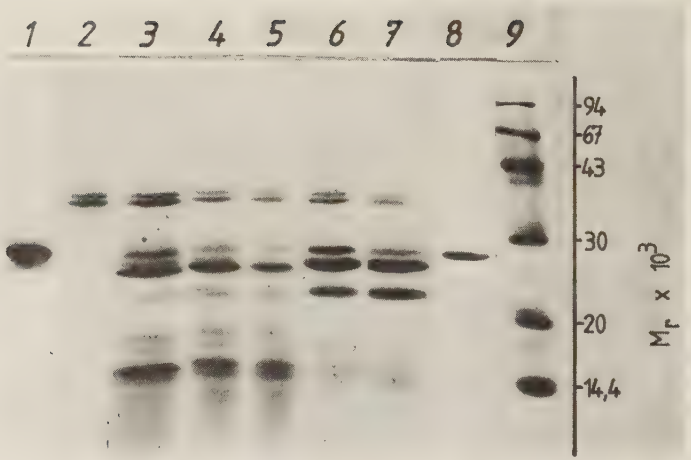


Abb.25: SDS-Gelelektrophorese von Fragmenten der cytoplasmatischen (3-5) und plastidären (6-7) Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase aus grünen Roggenblättern nach Hydrolyse mit 5 µg Staphylococcus aureus V8-Protease. Unverdaute Proben sind in den Spalten 1 (Cyto TIM) und 8 (Cp-TIM) dargestellt. Die Hydrolyse wurde vor der Elektrophorese in Reagenzgläsern durchgeführt. Die Inkubationszeiten betrugen 60 Minuten (3), 90 Minuten (4 und 6) und 180 Minuten (5 und 7). Spalte 2 zeigt die Protease V8 (5 µg). Als Eichproteine (9) wurden Phosphorylase B (94 KD); Rinderserumalbumin (67 KD); Eialbumin (43 KD); Carboanhydrase (30 KD); Trypsin-Inhibitor (20 KD) und α-Lactalbumin (14,4 KD) verwendet.

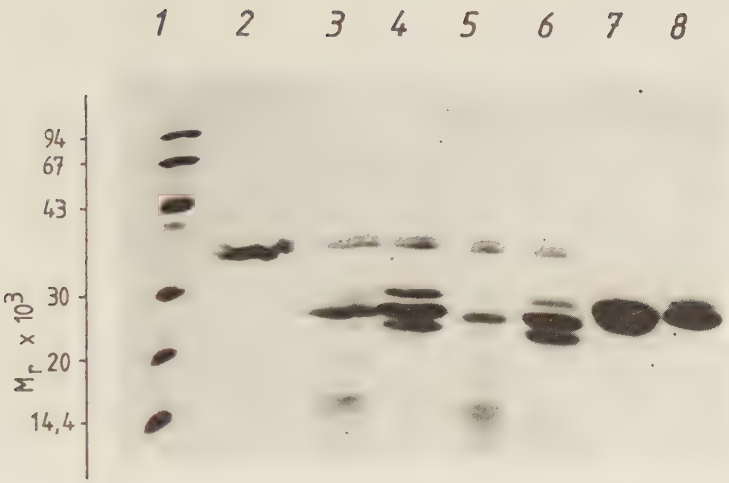


Abb.26: SDS-Gelelektrophorese von Fragmenten der cytoplasmatischen (3, 5) und plastidären (4, 6) Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase nach Hydrolyse mit 5/ug Staphylococcus aureus V8-Protease. Die Inkubationszeiten betrugen 90 min (3,4) und 180 min (5,6). Die unverdauten Proteine der cytoplasmatischen bzw. plastidären Isoenzyme sind in den Spalten 7 bzw. 8 dargestellt. Als Eichproteine (1) wurden Phosphorylase B (94 KD); Rinderserumalbumin (67 KD); Eialbumin (43 KD); Carboanhydrase (30 KD); Trypsin-Inhibitor (20 KD) und α-Lactalbumin (14,4 KD) verwendet. (Methode siehe II.3.7.7.2).

Die Proteolyse wurde während der Elektrophorese durchgeführt (Abb.24). Gemeinsam ist beiden Isoenzymen, daß

zuerst kleinmolekulare Peptide der Größenordnung 1 000 Dalton abgespalten werden, so daß zuerst Fragmente mit 26 000 und 25 000 Dalton entstehen. Die Gemeinsamkeiten zeigen sich bis zu Bruchstücken mit 17 000 Dalton. Obwohl die Intensität der Bandenmuster nach Färbung mit Coomassie durch die geringen Peptidkonzentrationen des cytoplasmatischen Isoenzyms schwächer ist, konnten Fragmente mit 22 000, 18 000 und 17 000 Dalton nachgewiesen werden. Erst im niedermolekularen Bereich sind Unterschiede in den Peptidmustern der beiden Isoenzyme festzustellen.

Tabelle 11 mit den Molekulargewichten der Peptide der cytoplasmatischen und plastidären Triosephosphat Isomerase zeigt zusammenfassend die Gemeinsamkeiten und Unterschiede in Bezug auf die Molekülgröße der entstandenen Bruchstücke.

V8-Protease

Cyto TIM	CpTIM
26 000	
25 000	25000
22 000	22 000
18 000	18 000
17 000	17 000
15 500	16 000
13 800	14 500
12 500	
	10 500

Tabelle 11: Molekulargewichte der Fragmente der cytoplasmatischen und plastidären Triosephosphat Isomerase nach Hydrolyse mit Staphylococcus aureus V8-Protease. Die Werte sind der Abbildung 24 entnommen. Die Isoenzymproteine wurden während der Elektrophorese im Sammelgel verdaut, und die Fragmente in einem 15-20% SDS-Gel aufgetrennt.

Die Abbildungen 25 und 26 zeigen die Peptidmuster der cytoplasmatischen und plastidären Triosephosphat Isomerase nach Hydrolyse mit Staphylococcus aureus V8-Protease. Anders als in Abbildung 24 wurden die Isoenzyme nicht während der Elektrophorese, sondern vorher in Reagenzgläsern verdaut, und der gesamte Ansatz (Protein und Protease) elektrophoretisch aufgetrennt.
Sehr deutlich kann man die Konzentrationsabnahme der Untereinheiten der cytoplasmatischen Triosephosphat Isomerase beobachten. Zuerst werden höhermolekulare Peptide angereichert, die sich mit der Zeit in den Molekulargewichtsbereich um 15 000 Dalton verlagern. Die Peptidmuster der cytoplasmatischen und plastidären Isoenzyme zeigen Gemeinsamkeiten. Man kann Fragmente beobachten, die gleiche apparente Molekulargewichte haben. Bis auf drei zusätzliche Peptide der cytoplasmatischen Triosephosphat Isomerase mit 18 800, 14 000 und 13 000 Dalton und einem möglicherweise überlagerten Bruchstück von 25 500 Dalton bei der plastidären Form erscheinen die Bandenmuster sehr ähnlich. Die Tabelle 12 bestätigt die weitgehende Übereinstimmung der Fragmente.

V8-Protease

cyto TIM	cp TIM
26 200	26 000
25 500	
23 000	23 000
22 500	
19 500	19 500
18 800	
17 500	17 500
16 000	16 000
15 500	15 500
14 000	
13 000	

Tabelle 12: Molekulargewichte der Fragmente der cytoplasmatischen und plastidären Triosephosphat Isomerase nach Hydrolyse mit Staphylococcus aureus V8-Protease. Die Hydrolyse wurde in Reagenzgläsern für 90 bzw. 180 Minuten durchgeführt, und die Fragmente wurden in 15-20% SDS-Gelen aufgetrennt. Die Werte sind der Abb. 25 entnommen und stellen Mittelwerte der Verdauungen für 90 und 180 Minuten dar.

Weitgehende Übereinstimmung zwischen den Peptidmustern der cytoplasmatischen und plastidären Triosephosphat Isomerase nach Proteolyse mit V8 zeigt die Abbildung 26. Die Proteine wurden wie bei Abb. 25 vor der Elektrophorese hydrolytisch gespalten. Allerdings ist die Auflösung der Fragmente mit geringer Peptidkonzentration schlechter als in Abb. 25.

Die Abb. 27 ist eine zusammenfassende Darstellung der Hydrolyse der cytoplasmatischen und plastidären Formen der Triosephosphat Isomerase mit V8-Protease. Zwei verschiedene Verdauungsverfahren (vor und während der Elektrophorese) mit Proteasekonzentrationen zwischen 0,5 und 5 µg ergeben bei Inkubationszeiten zwischen 60 und 180 Minuten weitgehend identische Peptidmuster. Ein markanter Unterschied ist der bei der cytoplasmatischen Form auftretende schnellere Abbau des Proteins, der bei beiden Verdauungsverfahren auftritt. Dieses zeigt sich besonders im höhermolekularen Bereich. Mit wenigen Ausnahmen haben beide Isoenzyme Fragmente mit gleichen Molekulargewichten, so daß man von einer 80-90% Identität in bezug auf Anzahl und Größe der Peptide sprechen darf Die Unterschiede in den Peptidmustern bestätigen andere Charakterisierungen der Isoenzyme, daß die multiplen Formen der Triosephosphat Isomerase zwei distinkte Proteine sind.

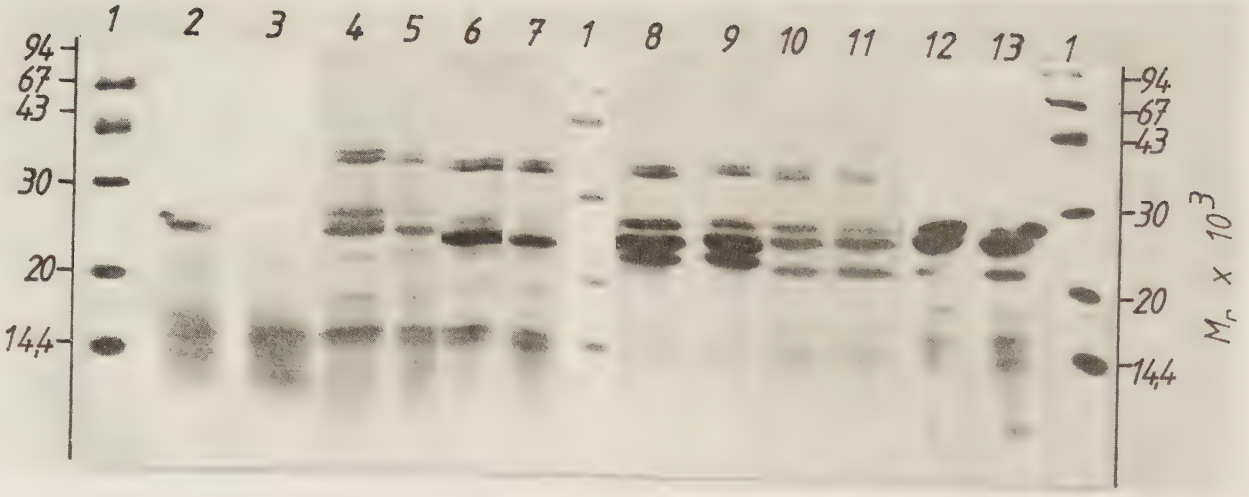


Abb.27: SDS-Gelelektrophorese von Fragmenten der cytoplasmatischen (2 - 7) und plastidären (8 - 13) Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase aus grünen Roggenblättern nach Hydrolyse mit Staphylococcus aureus V8Protease.
Die Proteolyse wurde vor (4 - 11) und während (2, 3, 12, 13) der Elektrophorese mit 0,5 µg (2, 12) und 5 µg (3 - 11) V8-Protease durchgeführt. Die Inkubationszeiten betrugen 30 min (2, 3, 12, 13) 60 min (4, 10), 90 min (6,8) und 180 min (5, 7, 9, 11). In Spalte 1 sind als Eichproteine mit bekannten Molekulargewichten Phosphorylase B (94 KD); Rinderserumalbumin (67 KD); Eialbumin (43 KD); Carboanhydrase (30 KD); Trypsin-Inhibitor (20 KD) und α-Lactalbumin (14,4 KD) dargestellt. Die Doppelbande bei 37 000 und 35 000 Dalton (4 - 11) ist die V8-Protease aus Staphylococcus aureus.

Ein Vergleich der Peptidmuster der Triosephosphat Isomerase-Isoenzyme aus grünen Roggenblättern mit den Mustern der multiplen Formen aus Placenta (Yuan et al., 1979) und Erythrozyten (Sawyer et al., 1972) des Menschen, die nach tryptischer Verdauung und Auftrennung durch Dünnschichtchromatographie erhalten wurden, zeigt, daß im Fall der Triosephosphat Isomerase aus Placenta beiden Isoenzymformen 22 von 26 bzw. 29 aufgetrennten Peptiden gemeinsam sind. Die Formen unterscheiden sich in 4 bzw. 7 Peptiden, die die andere Form jeweils nicht hat. Yuan et al. (1979) konnten keine Hybridformen der Triosephosphat Isomerase feststellen. 22 von 26 Peptiden und 22 von 29 Peptiden bezeugen die sehr große Ähnlichkeit der Triosephosphat Isomerase-Polypeptidketten aus Placenta untereinander.

Sawyer et al. (1972) trennten Isoenzyme aus Erythrozyten. Sie stellten fest, daß die dritte Form eine Hybridform der beiden anderen ist. Auch ihre Untersuchungen über die Gemeinsamkeiten der Polypeptidketten dieser drei Isoenzyme ergaben, daß je 17 Peptide nach tryptischer Verdauung identisch aufgetrennt wurden. Je 7 von 24 verschiedenen Peptiden waren unterschiedlich. Sie sind bei den homodimeren Isoenzymen mit identischen Untereinheiten (AA und BB) festgestellt worden. Die hybride Form zeigt dagegen die 14 Peptide zusätzlich. Die Isoenzymproteine haben im Fall der Triosephosphat Isomerase aus Placenta zu 82 % und bei den Erythrozytenformen zu 71% identische Fragmente, was bedeutet, daß die Trypsin spezifischen Aminosäuren Arginin und Lysin zu 82% bzw. 71% identische Positionen in der Aminosäuresequenz haben.

Für pflanzliche Triosephosphat Isomerase-Isoenzyme liegen Peptidmuster oder Aminosäuresequenzen noch nicht vor. Triosephosphat Isomerase-Isoenzym -Proteine aus grü-

nen Roggenblättern konnten nach partieller Hydrolyse mit Staphylococcus aureus V8-Protease in viele Peptide mit zum Teil gleichen apparenten Molekulargewichten aufgetrennt werden. Ein prozentualer Anteil an Gemeinsamkeiten kann nur indirekt bestimmt werden, da die Hydrolyse zeitlich limitiert war, und nur Peptide bis 10 000 Dalton elektrophoretisch aufgetrennt wurden.

3. ENTWICKLUNG DER TRIOSEPHOSPHAT ISOMERASE

Die cytoplasmatischen und plastidären Formen der Triosephosphat Isomerase aus Roggenkeimlingen haben sich in molekularen Eigenschaften wie den isoelektrischen Punkten, einer Glykosylierung der plastidären Form, den antigenen Determinanten und in den Peptidmustern nach chemischer und enzymatischer Spaltung deutlich voneinander unterschieden. Die Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase grüner Pflanzen sind zwei Kompartimenten zugeordnet, dem Cytoplasma und den Plastiden. Die Funktionen der cytoplasmatischen und plastidären Formen liegen in der Glykolyse und dem Pentosephosphat-Zyklus sowie in der photosynthetischen CO_2-Fixierung. Die Photosynthese aber findet nur in chlorophyllhaltigen Zellen statt. Während der Entwicklung durchläuft der Keimling das Stadium der Heterotrophie, in der noch keine photosynthesetreibenden Chloroplasten vorliegen. Wenn die plastidäre Form nur in grünem Gewebe katalytisch aktiv ist, wird dann die plastidäre Form nur in Verbindung mit der Chloroplastenbildung synthetisiert, und welches Kompartiment ist für die Bildung des plastidären Isoenzyms der Triosephosphat Isomerase verantwortlich?

Aus den Aktivitätsmessungen aus Blatt- und Sproßextrakten von Roggenkeimlingen, die bei 22°C oder 32°C im Dauerlicht und 22°C etioliert angezogen wurden, sehen wir, daß 24 Stunden nach dem Einquellen des Saatguts Triosephosphat Isomerase-Aktivität gemessen werden kann (Abb.28). Unter "normalen" Bedinungen, d.h. bei 22°C und Dauerlicht, nimmt die Aktivität bis zum 6. Keimungstag stetig zu. Der stärkere Anstieg bis zu 72 h beruht darauf, daß die in den nicht entfernten Koleoptilen lokalisierte Aktivität der TIM mitgemessen wurde. Dem stärkeren Anstieg folgt eine logarithmische Zunahme der Aktivität, die das 12-16fache der Anfangsaktivität er-

reicht. Bei etiolierten Keimlingen zeigt sich ein ähnlicher Aktivitätsverlauf. Nach sechs Tagen werden aber nur etwa 50% der Aktivität, die bei belichteten Pflanzen gemessen wurde, nachgewiesen. Das zeigt, daß die Aktivität der Triosephosphat Isomerase im Dauerlicht gesteigert wird.

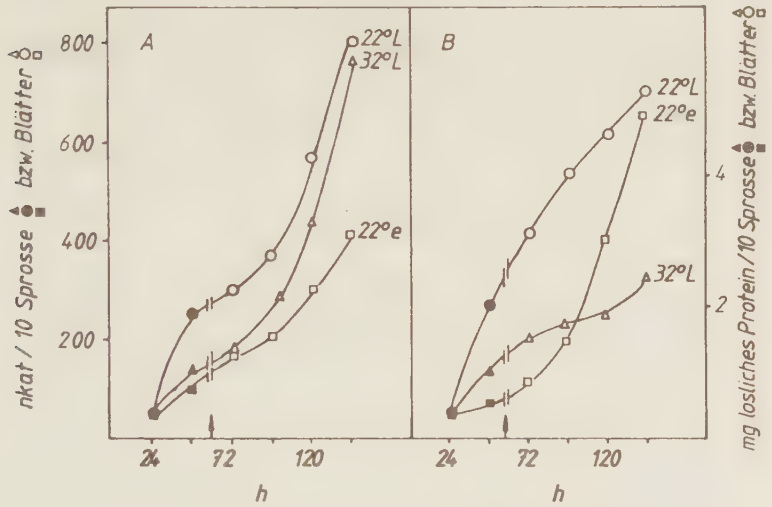


Abb.28: Gesamtaktivität der Triosephosphat Isomerase und Gehalt an löslichem Protein in Blatt- bzw. Sproßextrakten von je 10 Roggenkeimlingen, die bei 22°C bzw. 32°C im Dauerlicht (22°L bzw. 32°L) und bei 22°C in Dunkelheit (22°e) angezogen wurden, in Abhängigkeit von der Keimungsdauer. Von den Pflanzen, die bei 22°C angezogen wurden, wurden Extrakte aus den gesamten Sproßen bzw. dem gesamten Blatt hergestellt, während von den Keimlingen, die bei 32°C angezogen wurden, nur die unter Hälfte zur Extraktion verwendet wurde. Ab 72 h (siehe Pfeil) wurden nur Blätter bzw. Blatthälften genommen.

Vergleicht man zusätzlich zu der Aktivität den löslichen Proteingehalt von Licht- und Dunkelpflanzen, so ist aus Abb.28 B eine Verzögerung während der Entwicklung der etiolierten Pflanzen festzustellen. Die Zunahme der Proteinmenge hat ein Lag-Phase von etwa drei Tagen, um nach vier Tagen logarithmisch anzusteigen. Sechs Tage nach dem Quellen entspricht der Gehalt an löslichem Protein jedoch dem der Lichtpflanzen. Das zeigt, daß die Proteinsynthese nicht Licht-abhängig ist. Betrachtet man nur die Werte des 6. Tages von etiolierten und belichteten Pflanzen, die bei 22°C angezogen wurden, so könnte man eine Licht-Unabhängigkeit vermuten. Vergleicht man jedoch den Verlauf des Proteingehalts zwischem dem ersten und sechsten Tag, so sieht man, daß eine Licht-Stimulierung des Prozesses, vor allen Dingen in den ersten 72 Stunden, vorliegt.

Pflanzen, die bei 32°C und Dauerlicht gezogen wurden, verhalten sich dagegen in den ersten drei Tagen wie etiolierte Pflanzen mit einer verzögerten Aktivitätszunahme. Mit dem Durchbrechen des Primärblattes durch die Koleoptile gleichen sie eher belichteten Keimlingen, die bei 22°C angezogen wurden. Es schließt sich nach dem dritten Tag ebenfalls eine logarithmische Phase an. Der Proteingehalt dieser Extrakte nimmt etwa 50% des Proteingehalts der Pflanze ein, die bei 22°C und Dauerlicht wuchsen. Dabei muß berücksichtigt werden, daß von den Pflanzen, die bei 32°C angezogen wurden, nur die unter Hälfte des Primärblattes extrahiert wurde.

Mit der Untersuchung chlorotischer Blattgewebe aus Pflanzen, die bei 32°C gezogen wurden und deren Plastiden keine 70 s Ribosomen besitzen (Feierabend und Schrader-Reichhardt, 1976), liegt ein geeignetes System vor, Translationsprodukte des Cytoplasmas festzustellen. Somit können lösliche Proteine und Membranproteine nach

Isolation der Plastiden als solche Produkte identifiziert werden. Feierabend (1979) beschreibt, daß nach säulenchromatographischer Auftrennung von Blattextrakten 6 Tage alter Pflanzen, die bei 32°C und Dauerlicht angezogen wurden, an DEAE-Cellulose zwei Fraktionen mit Triosephosphat Isomerase-Aktivität erhalten wurden. Ein Vergleich dieser Extrakte mit Extrakten isolierter Chloroplasten zeigte, daß die mit höherer Salzkonzentration eluierte Fraktion den Chloroplasten bzw. Plastiden zugeschrieben werden konnte (Riese, 1976). Die plastidäre Form der Triosephosphat Isomerase wird ebenso wie das cytoplasmatische Isoenzym im Cytoplasma an 80 s Ribosomen synthetisiert.

Da der Translationsort des plastidären Isoenzyms der Triosephosphat Isomerase bekannt war, sollte durch säulenchromatographische und immunologische Untersuchungen ermittelt werden, wann die plastidäre Form synthetisiert wird, unter welchen Bedingungen die Synthese stattfindet und wie sich das Mengenverhältnis der Isoenzyme während der Entwicklung verändert.

Da für die plastidäre Form nur in belichteten Pflanzen volle Aktivität erwartet wurde, für die cytoplasmatische Form dagegen immer, sollte ein Vergleich an DEAE-Cellulose zeigen, ob sich Extrakte 6 Tage alter Dunkelpflanzen in zwei Fraktionen mit Triosephosphat Isomerase-Aktivität trennen lassen. Die Abbildung 29 zeigt, daß auch etiolierte Roggenkeimlinge plastidäre Triosephosphat Isomerase haben, und daß der Anteil dieser Form an der Gesamtaktivität bereits 25-35% beträgt. Das bedeutet, daß die Synthese der plastidären Form im Licht stimuliert wird.

Untersuchungen über den Anteil der Isoenzyme an der Gesamtaktivität der Triosephosphat Isomerase während der

Entwicklung, d.h. vom Samen bis zur Bildung des Primärblattes, sind für Roggenkeimlinge bisher nicht durchgeführt worden. Mit bloßen Aktivitätsmessungen war dieses auch nicht möglich. Durch ein geeignetes, isoenzymspezifisches Bestimmungsverfahren wurde die Darstellung des Verlaufs der Biosynthese unter verschiedenen Anzuchtsbedingungen der Pflanzen ermöglicht. Mit der Erzeugung spezifischer, gegen die cytoplasmatischen und plastidären Formen der Triosephosphat Isomerase gerichteter Antikörper wurde die Untersuchung durchgeführt.

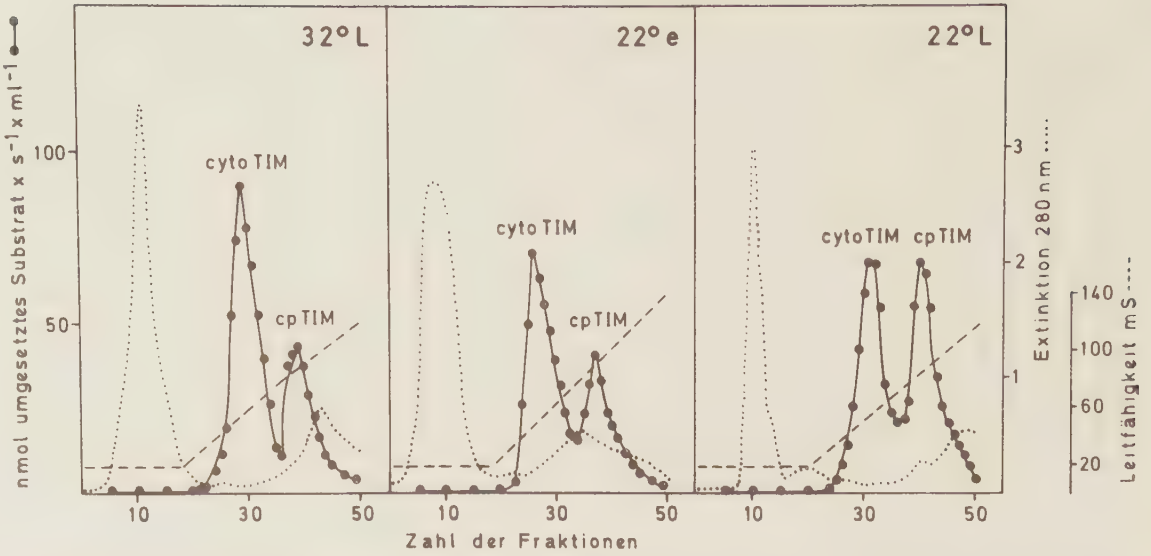


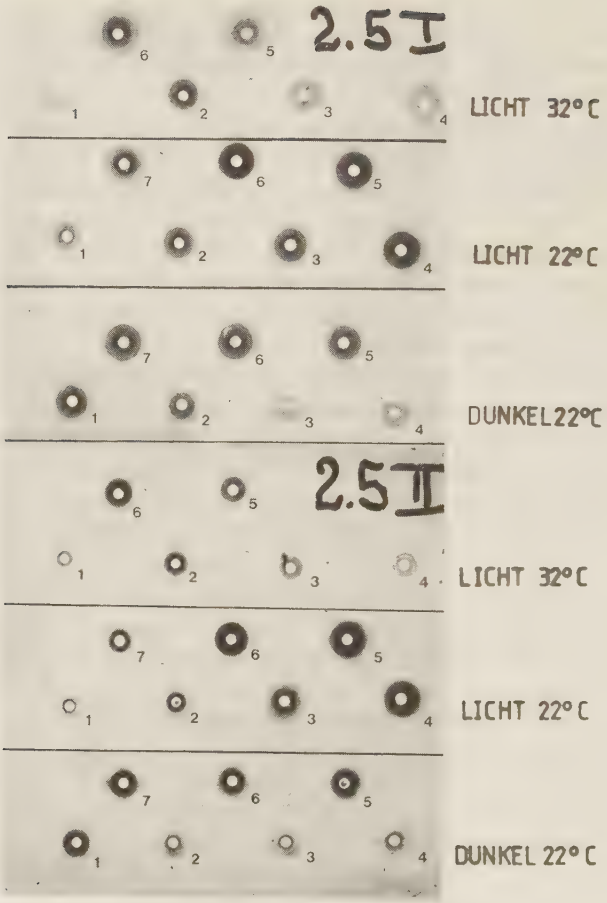
Abb.29: Darstellung der Elutionsprofile der Triosephosphat Isomerase-Isoenzyme nach DEAE-Cellulose-Chromatographie. Extrakte von je 1 g Blattgewebe 6 Tage alter Roggenkeimlinge, die bei 32°C im Dauerlicht (32°L), 22°C in Dunkelheit (22°e) und 22°C Dauerlicht (22°L) gezogen wurden, wurden säulenchromatographisch an DEAE-Cellulose (1 x 5 cm) mit einem linear ansteigenden KCl-Gradienten von 2 x 50 ml 0-200 mM KCl in Phosphatpuffer pH 8,6 aufgetrennt. Von den Pflanzen, die bei 32°C gezogen wurden, wurde nur die untere Hälfte der Blätter verwendet. Cyto TIM und Cp TIM stellen die cytoplasmatischen und plastidären Formen der Triosephosphat Isomerase dar.

Zur quantitativen Erfassung der Isoenzymproteine wurde die Einfach-Immundiffusion nach Mancini et al. (1965) durchgeführt. Nach Diffusion von Extrakten in dünnen Agarose-Gelen, die eine konstante Menge Antikörper enthalten, ist die entstehende Präzipitationsfläche ein Maß für die Menge des Antigens in den jeweiligen Proben. In den Abbildungen 30a/b sind zwei der Agaroseplatten mit Antigen-Antikörper-Komplexen dargestellt. Da die Menge der Antikörper gegen die multiplen Formen der Triosephosphat Isomerase in den jeweiligen Antiseren unterschiedlich war, wurden die Präzipitationsflächen der cytoplasmatischen und plastidären Isoenzyme aus grünen Pflanzen (Licht, 22°C) am 6. Tag für die Auswertung gleich 1:1 gesetzt. Das entsprach dem Verhältnis der Aktivität der Triosephosphat Isomerasen nach säulenchromatographischer Auftrennung (Abb.29). Obwohl die Antiseren gegen die plastidäre Form nicht monospezifisch waren (vgl. III.2.4.2) konnten sie für diese Untersuchungen eingesetzt werden, da in den verwendeten Extrakten die Konzentration des Fremdproteins so gering war, daß keine sichtbare Präzipitation erfolgte (Abb.18).

Die Auswertung der Präzipitationsflächen (Abb.30 a/b) in Abb.31 zeigt, daß die Biosynthese der cytoplasmatischen Isoenzyme aus Blatt- bzw. Sproßextrakten von Pflanzen, die bei 22°C bzw. 32°C in Dauerlicht bzw. bei 22°C etioliert angezogen wurden, parallel mit der Entwicklung der Primärblätter verläuft. Der Verlauf der Präzipitationsflächen des cytoplasmatischen Isoenzyms aus Dunkelpflanzen entspricht exakt dem Verlauf des Proteingehalts. In den ersten drei Tagen liegt eine Lag-Phase vor, der ein starker Anstieg bis zum sechsten Tag folgt. Die Konzentration des Proteins erreicht etwa 90% des Wertes sechs Tage alter Lichtpflanzen. Dieses Ergebnis steht voll im Einklang mit der Funktion der cytoplasmatischen Triosephosphat Isomerase während der Keimung.

Da die Glykolyse in den ersten sechs Tagen für den Abbau und Umbau der Speicherstoffe den wichtigsten Stoffwechselweg zur Herstellung von Zwischenprodukten und Energie (ATP) darstellt, muß mit dem Wachstum der Blätter durch Erhöhung der Zellzahl auch cytoplasmatische Triosephosphat Isomerase synthetisiert werden.

Von den Pflanzen, die bei 32°C und Dauerlicht angezogen wurden, wurde für die Untersuchung der Entwicklung der TIM-Isoenzyme nur der untere Teil verwendet. Dieser untere Teil der Primärblätter ist durch die temperaturbedingte Chlorose leicht erkennbar und enthält Plastiden, denen die 70 s Ribosomen fehlen und somit zu einer selbständigen Proteinsynthese unfähig sind. Die für die Synthese bereitstehenden Aminosäuren werden nicht mehr in den Plastiden, sondern im Cytoplasma eingesetzt. Dadurch erhöht sich zwar der Anteil der cytoplasmatischen Proteinsynthese, wie aus Abb.31 für beide Enzymformen der TIM gezeigt werden kann, nicht aber der Gesamtproteingehalt (Abb.28). Das cytoplasmatische Isoenzym der belichteten Pflanzen, die bei 32°C gezogen wurden, übertrifft am sechsten Tag mit 120% die Menge der cytoplasmatischen Form aus Pflanzen, die bei 22°C wuchsen. Auf ein ganzes Blatt hochgerechnet würde das mehr als eine Verdopplung des Proteins der TIM bedeuten.



30a

30b

Abb.30: Einfach-Immundiffusion der Triosephosphat Isomerase-Isoenzyme aus Sproß-(1-3) und Blattextrakten (4-7) von Roggenkeimlingen, die bei 22°C bzw. 32°C im Dauerlicht bzw. bei 22°C etioliert angezogen wurden. Das Alter der Pflanzen ist in Tagen (1-7) angegeben. Je 70 µl Extrakt diffundierte in je 2,5% Antiseren-haltige 1,2% Agarose (48 h; 4°C). Abb.30a und 30b zeigen die Antigen-Antikörper-Reaktionen mit den Antiseren anti-cyto TIM bzw. anti-cp TIM (2,5 I bzw. 2,5 II).

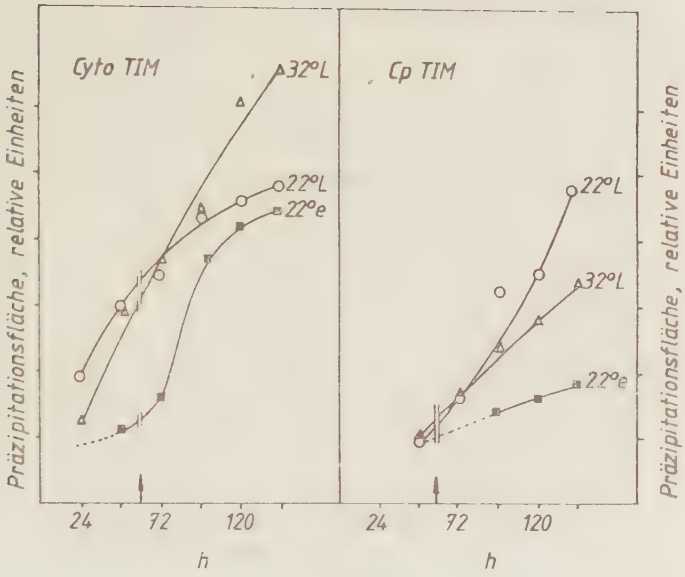


Abb.31: Vergleiche der Immunpräzipitationsflächen der cytoplasmatischen (Cyto TIM) und plastidären (Cp TIM) Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase aus Sproß-(Pfeil) und Blattextrakten von je 10 Roggenkeimlingen, die bei 22°C bzw. 32°C im Dauerlicht und bei 22°C etioliert angezogen wurden, in Abhängigkeit von der Keimungsdauer. Die Flächen wurden durch Radial-Immundiffusion nach Mancini et al. (1965) bestimmt. Die Flächen der Cyto TIM und Cp TIM (22°L) nach 144 Stunden wurden willkürlich ins Verhältnis 1:1 gesetzt (vgl. Abb.29).

Die Entwicklung des plastidären Isoenzyms verläuft unter "normalen" Bedingungen, d.h. bei permissiver Temperatur (22°C) und Dauerlicht, parallel zur Entwicklung des Keimlings. Nach ca. 72 Stunden, wenn die durch die Koleoptilen heraustretenden Spitzen der Primärblätter ergrünen, ist eine logarithmische Zunahme der plastidären Form der Triosephosphat Isomerase festzustellen. Nach sechs Tagen werden dem cytoplasmatischen Isoenzym äquivalente Proteinkonzentrationen bzw. Enzymaktivitäten gemessen (Abb.29 u. 31). Die hohe Wachstumstemperatur (32°C) und das Etiolement verzögern jedoch die Entwicklung des plastidären Isoenzyms. Obwohl bei beiden Anzuchtsbedingungen keine photosynthesetreibenden Chloroplasten vorliegen, beträgt der Anteil der plastidären Form der TIM etwa 33% der Gesamtaktivität. Feierabend und Schrader-Reichhardt (1976) konnten für ein weiteres Photosynthese-Enzym, die $NADP^+$-abhängige Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase ebenfalls nur ein Drittel der Gesamtaktivität messen, wenn die Pflanzen bei nicht-permissiver Temperatur angezogen wurden und das Enzym vor dem Test mit NADPH und Dithiothreitol maximal in vitro aktiviert wurde.

Die Kontrolle der Biosynthesen anderer plastidärer Enzyme wie die Aldolase, NAD^+-abhängige Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Phosphoglycerat-Kinase (Bradbeer, 1971), Phosphoribulokinase (Bradbeer et al., 1978), $NADP^+$-GAPDH (Müller et al., 1969) sowie Transketolase, Ribose-5-Phosphat Isomerase und Ribulose-bisphosphat Carboxylase (Feierabend und Pirson, 1966) werden dem Phytochromsystem zugeschrieben. Ob auch die plastidäre Form der TIM, die wie die oben genannten Enzyme (außer NAD^+-GAPDH) auch an Reaktionen des Calvin-Zyklus beteiligt sind, ebenfalls einer Phytochromkontrolle unterliegt, muß in weiteren Versuchen geklärt werden. Es ist jedoch als sicher anzunehmen, daß die Entwicklung der plastidären Form der TIM durch Licht stimuliert wird.

4. VERGLEICH DER TRIOSEPHOSPHAT ISOMERASE VERSCHIEDENER ORGANISMEN

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Triosephosphat Isomerase-Isoenzyme aus Roggenkeimlingen legen nahe, daß es sich um sehr ähnliche, aber nicht identische Proteine handelt. In vielen Aspekten (Molekulargewicht, Isoelektrischer Punkt) haben sich die Enzymformen der Triosephosphat Isomerase aus pflanzlichen und tierischen Geweben und einzelligen Organismen als konservative Proteine dargestellt. Durch immunologische Untersuchungen soll der Umfang dieser Gemeinsamkeiten weiter verfolgt werden. Da die Antiseren, die gegen die cytoplasmatische und plastidäre Form der Triosephosphat Isomerase erzeugt wurden, für jede ihrer Enzymformen spezifisch sind, ist eine Möglichkeit gegeben, heute noch bestehende Verwandtschaften der Proteine, die im Verlauf der Evolution bei verschiedenen Organismen divergierten, festzustellen. Die Antikörper gegen das Fremdprotein, die im Antiserum anti-cp TIM enthalten sind, stören nicht, da nur in angereicherten Extrakten die Konzentration des Fremdproteins so groß ist, daß sichtbare Präzipitationen entstehen. Gleichstrukturierte Epitope können daher durch die Antiseren, die ein Antikörpergemisch darstellen, das gegen viele Oberflächenstrukturen gerichtet ist, erkannt werden.

Es wurden die Enzymformen der Triosephosphat Isomerase aus grünen Blattgeweben der gleichen Familie und ferner verwandter Pflanzenfamilien untersucht. Dazu gehören die Monokotylen Roggen, Weizen, Hafer, Gerste und Mais und die Dikotylen Erbse, Baumwolle, Catharanthus und Tabak. Ferner wurden Extrakte aus E. coli und gereinigte Proteine der Triosephosphat Isomerase aus Hefe und Kaninchenmuskel verglichen. In der Abbildung 32 sind die Ergebnisse der Diffusion gegen die cytoplasmatischen

Antikörper dargestellt. Nicht alle Extrakte liegen in optimaler Konzentration vor. Teilweise sind die Antigen-Antikörper-Komplexe diffus. Die Präzipitationslinien der untersuchten Gramineen scheinen aber alle ineinander überzugehen. Daher ist als wahrscheinlich anzusehen, daß eine weitgehende Übereinstimmung zugänglicher Epitope vorliegt. Der Präzipitationskranz der Gramineen bildet mit der TIM aus E.coli bereits Sporen. Daraus läßt sich schließen, daß eine teilweise Identität der cytoplasmatischen Triosephosphat Isomerase aus Roggen (Gramineen) mit der Triosephosphat Isomerase aus E.coli besteht.

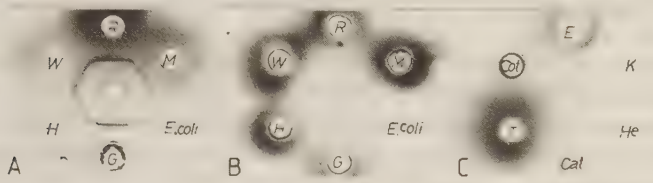


Abb.32: Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony
Immunpräzipitationen mit anti-cyto-TIM-Antikörpern (zentrale Löcher in A und C; in B wurde gereinigtes Serum vor der ersten Injektion angeboten). Es wurden Blattextrakte aus Roggen (R), Weizen (W), Hafer (H), Gerste (G), Mais (M), Erbse (E), Baumwolle (Cot), Catharanthus (Cat) und Tabak (T), sowie Extrakte aus E.coli Zellen und gereinigte Proteine der Triosephosphat Isomerase aus Hefe (He) und Kaninchenmuskel (K) angeboten. Die Präzipitationen wurden auf Proteine gefärbt.

Von den Extrakten dikotyler Pflanzen ist nur bei Tabak eine Reaktion mit dem Antikörperserum gegen die cytoplasmatische Triosephosphat Isomerase aus Roggen erkennbar. Die tierischen Formen der Triosephosphat Isomerase (Kaninchen) und die der Hefe präzipitieren nicht. Das heißt, daß die Evolution schon früh in zwei Stammbaumäste divergiert ist und funktionell identische Formen entwickelt hat. Bei Gräsern sind teils noch Determinanten wie bei E.coli vorhanden, aber jedoch nicht mit diesen Antiseren bei anderen höheren Pflanzen nachweisbar. Abb. 32 B zeigt, daß im Serum vor der Immunisierung keine Antikörper gegen die Proteine der TIM aus Pflanzen und E.coli enthalten sind.

Abb.33 zeigt Präzipitationslinien der TIM aus verschiedenen Pflanzenextrakten mit Antikörpern, die gegen die plastidäre Form der Triosephosphat Isomerase gerichtet sind.

Am Beispiel der Erbse und des Catharanthus kann man sehen, daß sich die plastidäre Form der Triosephosphat Isomerase 1. früh von der cytoplasmatischen Triosephosphat Isomerase getrennt entwickelt hat, denn die Triosephosphat Isomerase aus Erbse und Catharanthus reagieren nicht mit den anti-cyto-TIM-Antikörpern und 2. innerhalb der Chloroplasten scheint die Enzymform konstant geblieben zu sein. Das aber legt nahe, daß die plastidären Formen der Triosephosphat Isomerase verschiedener Pflanzen einen gemeinsamen Ursprung haben.

Abb.33: Doppeldiffusion nach Ouchterlony:
Immunpräzipitationen mit anti-cp-TIM-Antikörpern (zentrales Loch in A und C; in B wurde gereinigtes Serum vor der ersten Injektion angeboten). Es wurden Blattextrakte aus Roggen (R), Weizen (W), Hafer (H), Gerste (G), Mais (M), Erbse (E), Baumwolle (cot), Catharanthus (Cat) und Tabak (T), sowie ein Extrakt aus E.coli Zellen und gereinigte Proteine der Triosephosphat Isomerase aus Hefe (He) und Kaninchenmuskel (K) angeboten. Die Präzipitationen wurden auf Proteine gefärbt.

Gegen E.coli-, Hefe- und Kaninchen-Triosephosphat Isomerase als Antigen gibt es keine Antigen-Antikörper-Komplexe, da nur eine Form bei Hefe und E.coli bzw. drei Formen der Isomerase aus Kaninchen im Cytoplasma lokalisiert wurden.

In Abb. 34 sind die Präzipitationen von Triosephosphat Isomerase-Formen aus Extrakten von Blatt- und Wurzelgeweben dargestellt. Da die Triosephosphat Isomerase auf Grund ihrer enormen Aktivität für die Lokalisierung von Plastiden eingesetzt wird, sollte untersucht werden, ob die Antikörper gegen die Triosephosphat Isomerase-Formen aus Blattgeweben auch die Triosephosphat Isomerase in

den Wurzelgeweben präzipitieren. Wie zu sehen ist, gibt es mit Ausnahme der Extrakte aus Erbsenwurzeln schwache diffuse Antigen-Antikörper-Komplexe mit den anti-cyto-TIM-Antikörpern. Die Konzentration an Antigen, das gegen die anti-cp-TIM-Antikörper diffundierte, ist dagegen zu schwach. Die Präzipitationslinien sind erkennbar, lassen aber keine Aussage über Gemeinsamkeiten der Triosephosphat Isomerase aus Wurzelgeweben der verschiedenen Pflanzen zu.

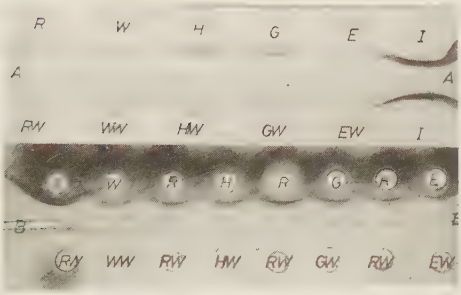


Abb.34: Doppeldiffusion nach Ouchterlony:
Immunpräzipitation mit anti-cyto-TIM-Antikörpern (Trog A) und anti-cp-TIM-Antikörpern (Trog B). Es wurden Extrakte aus Blatt- und Wurzelgeweben sieben Tage (R, W, H, G) bzw. 10 Tage (E) alter Pflanzen, die bei 22°C im Dauerlicht gezogen wurden, angeboten. Blattextrakte R=Roggen, W=Weizen, H=Hafer, G=Gerste, E=Erbse, Wurzelgewebe: RW=Roggen, WW=Weizen, HW=Hafer, GW=Gerste, EW=Erbse, I ist die gereinigte cytoplasmatische Form der Triosephosphat Isomerase aus Roggenkeimlingen.

IV. DISKUSSION

Die Triosephosphat Isomerase ist in allen untersuchten Geweben tierischen (Snapka et al., 1973) und pflanzlichen (Bukowiecki und Anderson, 1975) Ursprungs, sowie in Mikroorganismen (Gracy, 1975) und einzelligen Protophyten (Mo et al., 1973) nachgewiesen. Mikroorganismen und niedere Tiere besitzen nur eine Form des Enzyms. In Wirbeltieren treten bis zu drei Formen auf. Krietsch et al. (1970 a), Gracy (1975) und Kester et al. (1977) vermuteten aufgrund ihrer Ergebnisse, daß die Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase vom Kern kodiert und im Cytoplasma synthetisiert werden. Pontier und Hart (1981) konnten differentielle Genaktivierungen für die verschiedenen Isoenzymformen der Triosephosphat Isomerase während der Entwicklung von Knochenfischen nachweisen und die frühere Annahme, daß die TIM von zwei distinkten Genloci kodiert wird, bestätigen. Die Enzymformen sind aus zwei genetisch verschiedenen Polypeptidketten aufgebaut und erscheinen als Homo- und Heterodimere. Die Enzymformen sind alle im Cytoplasma lokalisiert und katalysieren Reaktionen der Glykolyse, der Gluconeogenese und des oxidativen Pentosephosphat-Zyklus. Die Proteine der Triosephosphat Isomerase-Formen sind sehr gut im Hinblick auf katalytische Eigenschaften und die Primärstruktur untersucht. Die Homologien in den Aminosäuresequenzen der TIM-Formen der verschiedenen Organismen wurden zwischen Bacillus st., Huhn, Kaninchen und Coelocanth mit mehr als 80% errechnet (Artavanis-Tsakonas und Harris, 1980). Dieses bedeutet eine sehr langsame Veränderung während der Evolution, d.h., 2 von 100 Aminosäuren werden pro 10^8 Jahren substituiert.
Bei pflanzlichen Formen der Triosephosphat Isomerase liegen vergleichbare Daten nicht vor. Die Untersuchungen haben sich bis heute auf katalytische Eigenschaften und Charakterisierungen der Tertiärstruktur beschränkt (Tur-

ner et al., 1965; Anderson, 1971a; Anderson und Advani, 1970; Tomlinson und Turner, 1979; Mo et al., 1973). Pflanzliche Gewebe und chlorophyllhaltige Einzeller weisen zwei unterscheidbare Formen mit unterschiedlicher Lokalisierung auf. Ein Isoenzym wird ebenfalls dem Cytoplasma, das andere Isoenzym den Chloroplasten zugeordnet (Anderson, 1971 a; Mo et al., 1973; Riese, 1976), wo es an Reaktionen des Calvin Zyklus und des oxidativen Pentosephosphat Zyklus teilnimmt. In der vorliegenden Arbeit wurden die cytoplasmatischen und plastidären Formen der Triosephosphat Isomerase aus Blattextrakten von Roggenkeimlingen bis zur Homogenität angereichert, um Unterschiede oder Gemeinsamkeiten hinsichtlich ihrer Struktur aufzuzeigen. Es wurden Trennverfahren auf der Basis unterschiedlicher Molekülgrößen, verschiedener Ladung und Kombinationen beider Verfahren angewendet. Die Reinheit der TIM-Proteine wurden durch mehrere Methoden abgesichert.

Aus dem Vergleich der nativen und SDS-denaturierten Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase aus Roggenkeimlingen konnte gefolgert werden, daß die multiplen Formen der TIM aus zwei gleich großen Untereinheiten mit 26.500 $\pm$ 500 Dalton zusammengesetzt sind. Dimere Strukturen mit Molekulargewichten um 54.000 $\pm$ 6.000 Dalton wurden auch für alle bisher untersuchten TIM-Formen tierischen, pflanzlichen und mikrobiellen Ursprungs durch Gelfiltrationen, verschiedener Methoden der Gelelektrophorese und Saccharosegradientenzentrifugationen und durch Röntgenstrukturanalyse (vgl. Tab.7) nachgewiesen. Die unterschiedlichen Größen der cytoplasmatischen und plastidären Form der TIM nach SDS-Gelelektrophorese von 500 Dalton machen deutlich, daß die Untereinheiten sehr wenig differieren (3 bis 5 Aminosäuren). In tierischen Organismen mit einer oder zwei Formen der Triosephosphat Isomerase sind die Untereinheiten ebenfalls als sehr

ähnlich bis zu völlig identisch beschrieben worden. Ob auch die pflanzlichen Isoenzymuntereinheiten innerhalb eines Isoenzyms vollkommen gleich sind, konnte bislang nicht gezeigt werden.

Der Vergleich weiterer molekularer Eigenschaften der Cyto-TIM und der Cp-TIM aus Roggen zeigte, daß es sich bei beiden Formen um zwei verschiedene Proteine handelt. Durch immunologische Verfahren konnte bestätigt werden, daß die Isoenzyme nur mit den gegen sie gerichteten Antikörpern Antigen-Antikörper-Komplexe bildeten und nicht kreuzreagierten. Damit ist bewiesen, daß die Isoenzyme eine unterschiedliche Oberflächenstruktur besitzen. Die verschiedenen Epitope der Isoenzymproteine können durch andere Aminosäuresequenzen oder sekundäre Veränderungen der Peptide (z.B. Glykosylierung) zustande gekommen sein.

Signifikante Unterschiede wurden auch bei der Bestimmung der isoelektrischen Punkte der Triosephosphat Isomerase-Isoenzyme beobachtet. Mit zwei verschiedenen Methoden konnten die isoelektrischen Punkte für die cytoplasmatische Form mit pH 4,7 und für die plastidäre Form mit pH 4,4 bestimmt werden. Auch die Ladungsunterschiede machen andere Aminosäuresequenzen für Isoenzyme sehr wahrscheinlich. Ähnliche Werte wurden auch für die Isoenzyme der TIM aus Euglena und Erbse (vgl. Tab.5) berichtet.

Wesentliche Unterschiede zwischen den cytoplasmatischen und plastidären Formen der TIM konnten durch Enzymtests in Abhängigkeit von der Temperatur und dem pH-Wert festgestellt werden (Kurzok, 1977). Die plastidäre Form weist gegenüber der cytoplasmatischen Form weit größere Hitzestabilität auf. Die Abhängigkeit vom pH-Wert ist unterschiedlich und gut interpretierbar. Da die Iso-

enzyme der TIM in zwei verschiedenen Kompartimenten lokalisiert sind, in denen unterschiedliche pH-Werte gemessen wurden, ist es verständlich, daß die Aktivitätsoptima der Isoenzyme ihrem jeweiligen Kompartiment angepaßt sind. Die cytoplasmatische Form arbeitet optimal bei pH 7,4, was den physiologischen Werten des Cytoplasmas entspricht. Dagegen wurde für die plastidäre Form ein pH-Optimum um 8,3 bestimmt. Das kommt dem pH-Wert der Chloroplastenmatrix bei Belichtung sehr nahe (Werdan et al., 1975). Hinsichtlich der Michaelis-Konstanten mit 6×10^{-4} bzw. $6{,}8 \times 10^{-4}$M für D-GAP und den Inhibitorkonstanten für Phosphoglykolat sind beide Formen der TIM nicht unterscheidbar. Vergleichbare Größenordnungen wurden auch von Anderson (1971a); Turner et al., (1965) und Tomlinson und Turner (1979) in Erbsenblättern (2×10^{-4} bzw. $4{,}2 \times 10^{-4}$M) und Erbsensamen ($3{,}6 \times 10^{-4}$ bzw. $4{,}4 \times 10^{-4}$M) gefunden. Die katalytischen Eigenschaften der Triosephosphat Isomerase-Isoenzyme sind gleich und benötigen keine gesonderte Regulation, da dieses durch die Kompartimentierung erreicht wird.

Nachweise hinsichtlich der Unterschiede in der Primärstruktur lassen sich mit den verschiedensten Verfahren durchführen. Die genaueste Methode ist die Aminosäuresequenzanalyse. Hinweise auf Strukturunterschiede können auch Aminosäurezusammensetzungen nach Totalhydrolyse oder "Fingerprint"-Analysen geben. In dieser Arbeit wurde ein von Cleveland et al. (1977) entwickeltes Verfahren benutzt, das als "eindimensionales Peptide-Mapping" nach begrenzter Proteolyse bezeichnet werden kann. Diese Methode ist bereits für die Darstellung von Speicherproteinen (Ma et al., 1980), Membranproteinen (Leong und Schweiger, 1979) und Isoenzymen der Pyruvat-Kinase (Saheki et al., 1978) eingesetzt worden. Mit Proteasen oder chemischen Reagenzien gespaltene Proteine der TIM-Isoenzyme wurden durch denaturierende Gelelektro-

phorese aufgetrennt. Die Ergebnisse nach Hydrolyse mit Proteasen ließen den Schluß zu, daß die multiplen Formen der TIM aus Roggen sehr ähnliche Proteine sein müssen, da sich die Muster der Peptide wenig unterscheiden. Einschränkend ist anzumerken, daß die Gleichheit der Peptidgrößen nichts über die Sequenz der Peptide aussagt, sondern nur, daß sie identisch zusammengesetzt sind.

Wesentliche Unterschiede fielen in der Stabilität gegenüber Proteaseverdauung auf. Das plastidäre Isoenzym der Triosephosphat Isomerase wurde schlechter gespalten als die cytoplasmatische Form, was möglicherweise durch den Kohlenhydratanteil bedingt ist, der einen natürlichen Schutz vor Proteolyse darstellt (Onishi et al., 1979). Die Isoenzyme unterscheiden sich auch in der mit der angewandten Methode nachweisbaren Anzahl der eingebauten Methioninreste. Näher zu untersuchen bleibt, ob eventuell ein Methionin als Startermolekül vorhanden ist und ob sich die verschiedenen Methioninreste auf jeweils identischen bzw. unterschiedlichen Untereinheiten befindet. Die Ergebnisse der cytoplasmatischen und plastidären Form in bezug auf Eigenschaften der Struktur und der Funktion sind in Tabelle 13 zusammengefaßt.

Eigenschaften der Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase

Art	Cyto-TIM	Cp-TIM	Methode / System
Temperatur-optimum	37,5 °C	50 °C	Enzymtest bei verschiedenen Temperaturen
pH-Optimum	7,45	8,45	Enzymtest bei verschiedenen Wasserstoffkonzentrationen
K_m (GAP)	6×10^{-4} M	$6,8 \times 10^{-4}$ M	Enzymtest bei verschiedenen Substratkonzentrationen
Isoelektrischer Punkt	4,6 4,7	4,4 4,45	Säulen-IEF in Saccharosegradient Platten-IEF in Agarosegelen
Molekulargewicht natives Enzym	53 000 50 000	54 000 54 000	Gelpermeationsfiltration Sedimentationsgeschwindigkeits-verfahren in Saccharosegradient
Molekulargewicht Untereinheit	26 500	27 000	SDS-Polyacrylamidgel-elektrophorese
Anzahl der Untereinheiten	2	2	errechnet nach SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese
Fragmente nach Bromcyan-Spaltung	4	3	Färbung nach SDS-Polyacrylamidgel-elektrophorese
Glykoprotein	nein	ja	Thymol-Schwefelsäure-Färbung
Gemeinsame antigene Determinanten	keine	keine	Ouchterlony-Doppeldiffusion und Enzymtest mit steigenden Antikörperkonzentrationen
Syntheseort	80 s Ribosomen Cytoplasma	80 s Ribosomen Cytoplasma	Anzuchtstemperatur 32°C, Nachweis durch Mancini-Einfachdiffusion und Anionenaustauscherchromatographie
Lichtstimulierung der Biosynthese	nein	ja	Mancini-Einfachdiffusion mit Extrakten aus Licht- und Dunkelpflanzen

Tabelle 13 : Zusammenfassende Darstellung der Eigenschaften der Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase aus Roggenblättern.

Wir stellen fest, daß die Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase aus Roggen in katalytischen Eigenschaften kaum unterscheidbar sind, die Strukturen der cytoplasmatischen und plastidären Formen jedoch verschieden sind. Daß dieses kein Einzelfall ist, soll der Vergleich der Aldolase-Formen aus Erbsenblättern bestätigen.

Anderson und Pacold (1972) beschreiben die Aldolase-Isoenzyme aus Erbsenblättern in Bezug auf pH-Optima, Michaelis-Konstanten und Inhibitor-Konstanten als annähernd identisch. Die membrangebundene Form der Chloroplasten hat gleiche katalytische Eigenschaften wie die lösliche Form des Cytoplasmas. Die Ähnlichkeit hinsichtlich kinetischer Parameter beider Formen läßt die Autoren vermuten, daß im Gegensatz zu tierischen Aldolase-Formen die pflanzlichen Formen trotz einer Kompartimentierung gleiche, nicht entgegengesetzte Funktionen besitzen. Tierischen Aldolase-Formen, die wie die Triosephosphat Isomerase-Formen im Cytoplasma lokalisiert sind, werden Funktionen im katabolischen oder anabolischen Stoffwechsel zugeschrieben (Rutter et al., 1968). Die Aldolase-Isoenzyme tierischer Gewebe haben aufgrund der Lokalisierung regulatorische Funktionen. Untersuchungen zu Eigenschaften, die von Anderson et al. (1975) durchgeführt wurden, zeigen, daß die Untereinheiten mit gleichen apparenten Molekulargewichten vorliegen und die terminalen Aminosäuresequenzen identisch sind. Bestimmungen der Aminosäurezusammensetzungen der Aldolase-Isoenzyme bewiesen, daß die plastidäre Form 7 Aspartylreste mehr und 4 Leucylreste weniger besitzt. Daher wird die Trennbarkeit durch isoelektrische Fokussierung ermöglicht (Anderson und Heinrikson, 1979). Ein Vergleich der Aminosäurezusammensetzungen von Aldolase-Formen der Erbse, Kaninchen, E.coli und Mikrokokkus aerogenes zeigte ebenfalls deutliche Übereinstimmungen und ließ die Autoren vermuten, daß die pflanzlichen Aldolase-Formen von einem

ursprünglichen Prototyp abstammen.

Die Ähnlichkeit cytoplasmatischer und plastidärer Enzymformen untereinander ist vielfach auch für andere Enzyme beschrieben worden. Anderson (1971 b), Anderson und Advani (1970), Anderson und Pacold (1972), Pacold und Anderson (1975) und Anderson et al. (1975) charakterisierten die Isoenzymformen der Ribose-5-Phosphat Isomerase, Phosphoglycerat Kinase und Fructosebisphosphat-Aldolase als in katalytischen Eigenschaften kaum unterscheidbare Proteine. Die Übereinstimmung vieler cytoplasmatischer und plastidärer Isoenzyme untereinander ist offensichtlich und deutet an, daß die Isoenzymformen der Plastiden und des Cytoplasmas relativ konservative Proteine sind.

Anderson und Levin (1970) wiesen nach, daß die Isoenzyme der Aldolase von zwei Genen kodiert werden. Über Kreuzungsexperimente konnten die Autoren zeigen, daß beide Aldolase-Isoenzyme Kern-kodierte Proteine sind. Der Syntheseort jedoch wurde nicht bestimmt. Nach dem Smillie und Scott (1969) die 70 s Ribosomen der Plastiden aus Euglena gracilis als Syntheseorte bestimmten, vermuteten Anderson und Levin, daß dieses auch für höhere Pflanzen gelte. Untersuchungen zur Biosynthese der Isoenzyme der Triosephosphat Isomerase aus Euglena gracilis (Mo et al., 1973) bestätigten Smillie und Scott, daß sowohl die Chloroplasten als auch das Cytoplasma ihre kompartimentspezifischen Enzyme an den 70 s bzw. 80 s Ribosomen selbst und unabhängig voneinander synthetisieren. Feierabend und Schrader-Reichhardt (1976) und Feierabend (1979) dagegen bestimmten bei höheren Pflanzen (Roggen) das Cytoplasma als Syntheseort für die cytoplasmatische und die plastidäre Form der TIM. Chlorotische Blattgewebe aus Roggenkeimlingen, die bei 32°C und Dauerlicht angezogen wurden, besitzen Plastiden ohne 70 s Ribo-

somen, wodurch die plastidäre Proteinsynthese unterbunden ist. Durch immunologische Verfahren konnte in dieser Arbeit klar gezeigt werden, daß beide Enzymformen cytoplasmatische Translationsprodukte sind.

Die immunologischen Nachweisverfahren ermöglichten auch eine Darstellung des Verlaufs der Biosynthese der cytoplasmatischen und plastidären Form der TIM in den ersten sechs Tagen der Keimung. Die Entwicklung der cytoplasmatischen Form der TIM verläuft von Beginn der Keimung an parallel mit der Entwicklung des Blattes, während die plastidäre Form erst nach einer Verzögerung von 72 Stunden stärker synthetisiert wird. Die verschiedenen Anzuchtsbedingungen (Licht bzw. Dunkelheit) geben für das cytoplasmatische Isoenzym jeweils Kurvenverläufe, die den Profilen des Gehalts an löslichem Protein gleichen. Die plastidäre Form wurde in etiolierten Pflanzen nur zu 50% des Anteils lichtgezogener Pflanzen synthetisiert. Das zeigt, daß die Bildung der cytoplasmatischen Form nicht Licht-abhängig ist, die der plastidären Form jedoch in Licht um Faktor 2 stimuliert wird. Das aber heißt, daß die Polypeptide der TIM unabhängig voneinander synthetisiert und sehr wahrscheinlich unterschiedlich reguliert werden. Wie wäre das möglich, wenn nicht zwei voneinander unabhängige Gene vorlägen, deren Expression unterschiedlich beeinflußt wird?

Wenn eine Steigerung der Syntheseleistungen in Licht um 200% möglich ist, so müssen dafür Photorezeptoren vorliegen, die direkt oder indirekt auf die Enzyme oder deren Synthese wirken. Pflanzen besitzen als Sensorpigmente das Phytochrom, einen Blau/UV-Licht-Photorezeptor (Mohr, 1981), Protochlorophyll und Chlorophyll. Für viele Enzyme, die nicht ausschließlich in Chloroplasten vorkommen und speziell an Photosynthesereaktionen teilnehmen, ist eine Kontrolle durch das Phytochromsystem nachge-

wiesen. (Schopfer, 1977). "In vivo" agiert Licht auch unabhängig vom Phytochrom durch die durch photosynthetische Reaktionen gebildeten Reduktanten, durch das reduzierte "Light-Effect-Mediator"-System (Mohamed und Anderson, 1981) durch Enzym-Effektoren, hohe Mg^{2+}-Konzentrationen und pH-Änderungen (Buchanan, 1980) auf bereits synthetisierte Enzyme. Enzyme können aus belichteten, vor der Extraktion dunkelgehaltener Gewebe durch optimierte Tests "in vitro" aktiviert werden. Beispiele dafür sind die NADP-GAPDH aus Spinat (Müller et al., 1969), aus etiolierten Erbsen (Anderson, 1973) und Roggen (Feierabend und Schrader-Reichhardt, 1976), Ribulosebisphosphat-Carboxylase (Feierabend und Pirson, 1966). Eine Licht-"Aktivierung" der plastidären Form der TIM kommt sehr wahrscheinlich nicht in Frage, da die Verhältnisse der Aktivitäten der cytoplasmatischen und plastidären Form zueinander eng mit den entsprechenden Mengen an Isoenzymprotein korreliert sind. Untersuchungen, ob eventuell das Phytochromsystem die Synthese der plastidären Form der TIM stimuliert, stehen noch aus.

Die Synthese des plastidären Isoenzyms der Triosephosphat Isomerase wird an 80 s Ribosomen des Cytoplasmas durchgeführt. Die Funktion des aktiven Proteins ist aber innerhalb der Chloroplasten. Daher muß nach der Synthese ein Transfer des Proteins vom Cytoplasma in die Chloroplasten stattfinden, der durch spezifische Mechanismen ermöglicht wird. Moleküle größer als 10 000 Dalton können nach Douce und Joyard (1979) nicht durch die Chloroplastenmembranen diffundieren. Es werden mehrere Wege postuliert, die eine Translokation cytoplasmatisch synthetisierter Proteine ermöglichen.

Die von Blobel und Dobberstein (1975) entwickelte "Signal"-Hypothese setzt voraus, daß durch eine bestimmte Aminosäuresequenz am N-terminalen Ende des Proteins

die Bindung der Ribosomen mit Membranen zustande kommt und die synthetisierten Proteine co-translational durch zeitlich vorhandene Poren in den Membranen in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) injiziert werden. Nach der Injektion lösen sich die Ribosomen von der Membran. Die Hypothese von Blobel und Dobberstein wurde dahingehend zwingender, als immer mehr Precursorproteine in "in vitro"-Systemen gefunden wurden. Eine Variante dieser Hypothese wurde von Ellis et al. (1979) entwickelt, die die Autoren "Envelope Carrier"-Hypothese nennen. Im Gegensatz zur "Signal"-Hypothese wird angenommen, daß die Proteine an freien Ribosomen synthetisiert werden, da es bislang keine sicheren Beweise für Chloroplastenmembran-gebundene Ribosomen gibt. Das Prozessing, d.h., das Abtrennen der Signalsequenz wird als posttranslationales Ereignis gesehen, das im Stroma der Chloroplasten stattfindet. Smith und Ellis (1979) konnten dieses für die kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase aus Erbsen nachweisen. Der Mechanismus der Erkennung und des Transports der kleinen Untereinheit der RuBPCO ist nach Feierabend und Wildner (1978) cytoplasmatischen Ursprungs, da auch in "32^{o}C-Plastiden" dieses Protein immunologisch nachweisbar ist.

Für alle cytoplasmatischen Translationsprodukte, die in die Chloroplasten transferiert werden, müssen besondere Erkennungsstrukturen vorliegen. Nach von Heinje und Blomberg (1979) sollten Proteine einen hohen Anteil an hydrophoben Aminosäuren besitzen, um an die Membran binden zu können. Simcox und Dennis (1978) halten die Ladung plastidärer Proteine für wichtig, bestimmte Chloroplastenbereiche zu erkennen. Bei der Untersuchung cytoplasmatischer und plastidärer Isoenzyme wurde weitgehend festgestellt, daß die plastidären, zu transportierenden Enzyme negativer geladen sind als die cytoplasmatischen. Das trifft auch für die Triosephosphat Isomerase aus

Roggen zu.

Eine weitere Eigenschaft des plastidären Proteins der Triosephosphat Isomerase ist die Glykosylierung. Obwohl nur wenige Hinweise, meist bei tierischen Proteinen, vorliegen, daß Zuckeranteile Voraussetzungen für einen Transport schaffen, so ist es doch auffällig, daß viele Proteine, die über eine Membran transportiert werden, glykosyliert sind. Es werden viele Funktionen postuliert, doch bislang gibt es keine allgemein akzeptierte Meinung. Sharon und Lis (1981) sehen in der Glykosylierung eine Änderung der Hydrophobizität, der elektrischen Ladung, der Masse und der Größe des Proteins. Onishi et al. (1979) diskutieren die Glykosylierung als Funktion der Faltung der Proteine in eine aktive Konformation, die während der Synthese der Polypeptidkette durchgeführt wird. Auch seien Proteine, deren Glykosylierung durch Tunicamycin verhindert wurde, anfälliger gegenüber Proteolyse, würden nicht transportiert und z.T. nicht prozessiert. Es wird ebenfalls postuliert, daß der Zuckeranteil die Funktion hat, die Membranen zu erkennen und zu binden, damit die Proteine transportiert werden können. Die Lokalisation der Glycosyltransferase im rauhen ER, wo sie an der Bindung der lipid-gebundenen Zuckerzwischenstufen und der Bildung der Glykoproteine beteiligt ist (Nagahashi und Beevers, 1968), deutet klar entgegengesetzte Funktion des Zuckeranteils an. Das würde bedeuten, daß die Glykosylierung erst während oder nach dem Transport des Proteins ins ER stattfinden würde, um durch Veränderung hydrophober zu hydrophilen Eigenschaften das Protein an einem Rücktransport zu hindern.
Die Ergebnisse und die Aussagen über die Funktion der Glykosylierung sind zur Zeit noch zu widersprüchlich, um

sich auf eine bestimmte Funktion festlegen zu können. Für die plastidäre Form der Triosephosphat Isomerase bleibt vorerst nur die Koinzidenz mit anderen, durch Membranen transportierte und glykosylierte Proteine .

Im Verlauf der Charakterisierung der Triosephosphat Isomerase-Isoenzyme aus Roggen konnten im Vergleich mit TIM-Formen tierischen, pflanzlichen und mikrobiellen Ursprungs große Übereinstimmungen in struktureller und katalytischer Hinsicht festgestellt werden. Inwieweit auch immunologische Eigenschaften übereinstimmen, sollten Doppeldiffusionstests zeigen. Dies ist insofern möglich, als die Antiseren gegen die cytoplasmatischen und plastidären Formen der TIM Gemische vieler Antikörperpopulationen darstellen.

Die Antikörper gegen die TIM-Isoenzyme präzipitieren am besten mit den TIM-Proteinen der gleichen Familie, wodurch angezeigt wird, daß wenige Veränderungen der Proteine im Verlauf der Evolution stattfanden. Antikörperreaktionen mit der TIM aus E.coli lassen schließen, daß das "ursprünglichere" Protein der Prokaryonten mit einem hohen Anteil an Gemeinsamkeiten bei den cytoplasmatischen Formen der TIM bei Gramineen erhalten geblieben ist. Die Tatsache, daß die Präzipitationslinien zwei Sporne bilden, zeigt, daß noch gleiche antigene Determinanten vorliegen. Die Antikörper gegen die plastidäre Form der TIM präzipitierten ebenfalls nicht nur die TIM-Proteine einer Familie, sondern darüber hinaus auch Proteine fremder, nicht näher verwandter Arten wie Erbsen, Catharanthus und Tabak.

Mit den für die cytoplasmatischen und plastidären Formen der Triosephosphat Isomerase spezifische Antiseren konnte gezeigt werden, daß immunologische Erkennungsstrukturen der Isoenzyme über viele Pflanzenfamilien erhalten

blieben. Man kann - auch im Vergleich der kinetischen und strukturellen Eigenschaften der verschiedenen Formen der Triosephosphat Isomerase anderer Organismen - die Isoenzyme der TIM aus Pflanzen als konservative Proteine bezeichnen, wie dieses von Artavaniś-Tsakonas und Harris (1980) für tierische Formen getan wurde.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Aus Extrakten von Roggenblättern lassen sich eine cytoplasmatische und eine plastidäre Form durch Elektrophorese auftrennen. Beide Formen wurden in der vorliegenden Arbeit vergleichend untersucht.

I. Die Reinigung der Isoenzyme wurde mit folgenden Schritten durchgeführt: 1. Die Isoenzyme wurden durch Ammoniumsulfat (40-80% Endkonzentration) konzentriert und durch Säurefällung bei pH 4,7 vorgereinigt. 2. Die Isoenzyme wurden durch Anionenaustauscherchromatographie an DEAE-Sepharose Cl-6B getrennt. 3. Durch Gelfiltration an Ultrogel AcA 44 wurden jeweils höher- und niedermolekulare Proteine von den Isoenzymproteinen abgetrennt. 4. Die "Salting-Out"-Chromatographie an Sepharose 4B trennte Proteine aufgrund steigender Löslichkeiten auf. 5. Die Isoenzyme wurden durch eine präparative Elektrophorese gereinigt.

II. Es wurden molekulare Eigenschaften der cytoplasmatischen (Cyto-TIM) und der plastidären (Cp-TIM) Triosephosphat Isomerase untersucht: 1. Die isoelektrischen Punkte wurden durch Fokussierung in einer IEF-Säule bzw. in Agarosegelen für die Cyto-TIM mit pH 4,6 bzw. 4,7 und für die Cp-TIM mit pH 4,4 bzw. 4,45 bestimmt. 2. Die Molekulargewichte der Cyto-TIM bzw. der Cp-TIM wurden durch Gelpermeationsfiltration mit 53 000 bzw. 54 000 Dalton und durch das Sedimentationsgeschwindigkeitsverfahren in linearen Saccharosegradienten mit 50 000 bzw. 54 000 Dalton bestimmt. Für denaturierte Polypeptide der Cyto-TIM bzw. Cp-TIM wurden durch Polyacrylamidgelelektrophorese in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat 26 500 bzw. 27 000 Dalton festgestellt. Aufgrund dieser Befunde sind die nativen Holoenzyme beider Formen aus zwei Untereinheiten aufgebaut. 3. Ouchterlony-Doppel-

diffusionen zeigten nur Präzipitationen der Cyto-TIM mit dem spezifischen Antiserum gegen die cytoplasmatische Form bzw. der Cp-TIM mit dem spezifischen Antiserum gegen die plastidäre Form der TIM. Die Aktivitäten der beiden Isoenzyme ließen sich nur mit den gegen sie gerichteten Antiseren hemmen, woraus geschlossen wurde, daß keine gemeinsamen antigenen Determinanten vorliegen. 4. Unterschiede in den Primärstrukturen der Cyto-TIM bzw. der Cp-TIM wurden nach begrenzter Hydrolyse mit Bromcyan und mit den Proteasen Papain und V8 aus Staphylococcus aureus nachgewiesen. Die chemische Hydrolyse mit Bromcyan zeigte nach Auftrennung der Peptide unter denaturierenden Bedingungen in 15-20% Gelen 4 Peptide der Cyto-TIM und 3 Peptide der Cp-TIM mit jeweils verschiedenen apparenten Molekulargewichten. Die Proteolyse mit Papain zeigte trotz suboptimaler Bedingungen große Unterschiede in den Peptidmustern. Die Verdauungsmuster der Hydrolyse mit V8 sind sehr ähnlich, haben aber dennoch signifikante Unterschiede. Durch die enzymatischen Hydrolysen wurde die plastidäre Form der TIM wesentlich langsamer abgebaut als die cytoplasmatische Form. Die Unterschiede in den Primärstrukturen der Cyto-TIM und der Cp-TIM machen zwei Gene sehr wahrscheinlich, womit "echte" Isoenzyme vorliegen. 5. Mit dem Thymol-Schwefelsäure-Reagenz konnte die Cp-TIM als Glykoprotein nachgewiesen werden. Ein Glykoproteinnachweis mit dieser Methode verlief für die Cyto-TIM negativ.

III. Die Entwicklung der Cyto-TIM bzw. der Cp-TIM wurde mit DEAE-Cellulose-getrennten Fraktionen verfolgt, und der Verlauf der Biosynthese der einzelnen Isoenzyme Cyto-TIM und Cp-TIM immunologisch mit Hilfe der Mancini-Technik quantitativ dargestellt. 1. Aus Extrakten chlorotischer Blatteile, die 70 s Ribosomen-freie Plastiden enthalten, wurden beide Isoenzyme getrennt. Dadurch wurden die 80 s Ribosomen des Cytoplasmas als Synthese-

ort für die beiden Isoenzyme der TIM bestimmt. 2. Die Entwicklung der Cyto-TIM folgt in Blättern - sowohl im Dauerlicht als auch in Dunkelheit - der Zunahme des Proteingehalts. Die plastidäre Form der TIM wird sowohl in belichteten als auch in etiolierten Pflanzen verzögert gebildet. Die Anteile der Cp-TIM an der Gesamtaktivität betragen nach sechs Tagen in etiolierten Pflanzen etwa 30% und in belichteten Pflanzen 50%. Die Synthese der plastidären Form wird in Licht gesteigert.

IV. Immunologische Vergleiche der Triosephosphat Isomerase aus Roggen mit TIM-Formen anderer Organismen zeigten nach Ouchterlony-Doppeldiffusion folgende Ergebnisse: Mit dem Antiserum gegen die cytoplasmatische Form der Triosephosphat Isomerase ergaben sich Präzipitationen mit TIM-Formen in Rohextrakten aus Gramineen (Gerste, Hafer, Weizen, Mais), Tabak und Escherichia coli. Mit tierischen Formen (Kaninchen) und der TIM aus Hefe wurden keine Kreuzreaktionen festgestellt. Mit dem Antiserum gegen die plastidäre Form der Triosephosphat Isomerase wurden Präzipitationen der TIM-Formen in Rohextrakten aus Gerste, Weizen, Hafer, Mais, Tabak, Erbse und Catharanthus beobachtet. Die TIM-Formen aus Escherichia coli, Kaninchen und Hefe ergaben keine Kreuzreaktionen.

VI. LITERARTURNACHWEISE

ALLINGTON, W.B., A.L. CORDRY, G.A. McCULLOUGH, D.E. MITCHELL, and J.W. NELSON: Electrophoretic Concentration of Macromolecules.
Anal. Biochem. (1978) 85, 188-196

ANDERSON, J.W.: Extraction of Enzymes and Subcellular Organelles from Plant Tissues.
Phytochemistry (1968) 7, 1973-1988

ANDERSON, L.E. and D.A. LEVIN: Chloroplast Aldolase is Controlled by a Nuclear Gene.
Plant Physiol. (1970) 46, 819-820

ANDERSON, L.E. and V.R. ADVANI: Chloroplast and Cytoplasmic Enzymes: Three Distinct Isoenzymes Associated with the Reductive Pentose Phosphate Cycle.
Plant Physiol. (1970) 45, 583-585

ANDERSON, L.E.: Chloroplast and Cytoplasmic Enzymes: III. Pea Leaf Ribose 5-Phosphate Isomerase. Biochim.Biophys.Acta (1971 b) 235, 245-249

ANDERSON, L.E.: Chloroplast and Cytoplasmic Enzymes: II. Pea Leaf Triose Phosphate Isomerase. Biochim. Biophys.Acta (1971 a) 235, 237-244

ANDERSON, L.E. and I. PACOLD: Chloroplast and Cytoplasmic Enzymes. IV. Pea Leaf Fructose 1,6-Diphosphate Aldolases. Plant Physiol, (1972) 49, 393-397

ANDERSON, L.E.: Dithiothreitol Activation of Some Chloroplast Enzymes in Extracts of Etiolated Pea Seedlings. Plant Sci. Lett. (1973) 1, 331-334

ANDERSON, L.E., R.L. HEINRIKSON an C. NOYES: Chloroplast and Cytoplasmic Enzymes. Subunit Structure of Pea Leaf Aldolases. Arch. Biochem. Biophys. (1975) 169, 262-268

ANDERSON, L.E. and R.L. HEINRIKSON: Chloroplast and Cytoplasmic Enzymes. VIII. Amino Acid Composition of the Pea Leaf Aldolases. Plant Physiol. (1979) 64, 404-405

ANDREWS, P.: The Gel-Filtration Behaviour of Proteins Related to Their Molecular Weights over a Wide Range. Biochem. J. (1965) 96, 595-606

ARNON, R.: Papain. Methods in Enzymology (1970) 19, 226-244

ARTAVANIS-TSAKONAS, Sp. and J.I. HARRIS: Primary Structure of Triosephosphate Isomerase from BACILLUS stearothermophilus. Eur. J. Biochem.(1980) 108, 599-611

BEISENHERZ, G.: Triosephosphate Isomerase from Calf Muscle. Methods in Enzymology (1955) 1, 387-391

BERZBORN, R.J.: Antibody Approach to Membrane Architecture. Methods in Enzymology (1980) 69, 492-502

BLOBEL, G. and B. DOBBERSTEIN: Transfer of Proteins Across Membranes. I. Presence of Proteolytically Processed and Unprocessed Nascent Immunoglobulin Light Chains on Membrane-Bound Ribosomes of Murine Myeloma. J.Cell Biol. (1975) 67, 835-851

BRADBEER, J.W.: Plastid Development in Primary Leaves of PHASEOLUS vulgaris. The Effects of Short Blue, Red, Far-Red and White Light Treatments on Dark-Grown Plants. J. Exp.Bot. (1971) 22, 382-390

BRADBEER, J.W., D.F.HARGRAVE and L. LANGMAN: The Photomorphogenetic Control of the Development of Plastid Glyceraldehydephosphate Dehydrogenase and Phosphoribulokinase Activities in Cotyledons of Mustard Seedlings. Photochem. Photobiol. (1978) 27, 183-187

BUCHANAN, B.B.: Role of Light in the Regulation of Chloroplast Enzymes. Ann.Rev. Plant Physiol. (1980) 31, 341-374

BUKOWIECKI, A.C.and L.E.ANDERSON: Multiple Forms of Aldolase and Triose Phosphate Isomerase in Diverse Plant Species. Plant Sci. Lett. (1975) 5,49-55

BÜNGER, W. and J. FEIERABEND: Capacity for RNA Synthesis in 70s Ribosome-deficient Plastids of Heat-bleached Rye Leaves. Planta (1980), 149, 163-169

CLARKE, H.G.M. and T. FREEMAN: A Quantitative Immuno-Electrophoresis Method (Laurell Electrophoresis). Protides of the Biological Fluids (1966) 14, 503-509

CLEVELAND, D.W., St.G.FISCHER, M.W. KIRSCHNER and U.K. LAEMMLI: Peptide Mapping by Limited Proteolysis in Sodium Dodecyl Sulfate and Analysis by Gel Electrophoresis. J. Biol.Chem. (1977) 252, 1102-1106

CORRAN, P.H. and S.G. WALEY: The Amino Acid Sequence of Rabbit Muscle Triose Phosphate Isomerase. FEBS Letters (1973) 30, 97-99

CORRAN, P.H. and S.G. WALEY: The Amino Acid Sequence of Rabbit Muscle Triose Phosphate Isomerase. Biochem. J. (1975) 145, 335-344

DABROWSKA, A., I. KAMROWSKA and T. BARANOWSKI: Purification, Crystallization and Properties of Triosephosphate Isomerase from Human Skeletal Muscle. Acta Biochim. Pol. (1978) 25, 247-256

DAUSSANT, J., C.LAURIERE, N.CARFANTAN and A. SKAKOUN: Immunochemical Approaches to Questions Concerning Enzyme Regulation in Plants. aus: Phytochem Soc. Symp. Series No.14, Regulation of Enzyme Synthesis and Activity in Higher Plants, Ed. H.Smith (1977) S.197-223

DAUSSANT, J. and R.D. HILL: Immunochemical Identification of -Amylases in Developing, Mature and Germinated TRITICALE Seeds. Physiol. Plant. (1979) 45, 255-259

DIRIENZO, J.M., K. NAKAMURA and M. INOUYE: The outer Membrane Proteins of Gram-Negative Bacteria: Biosynthesis, Assembly and Functions. Ann. Rev. Biochem. (1978) 47, 481-532

DOUCE, R. and J. JOYARD: Structure and Function of the Plastid Envelope. Adv. Bot.Res. (1979) 7, 2-116

DRAPEAU, G.R., Y.BOILY and J. HOUMARD: Purification and Properties of an Extracellular Protease of STAPHYLOCOCCUS aureus. J. Biol. Chem. (1972) 247, 6720-6726

EBER, St.W. and W.K.G. KRIETSCH: The Isolation and Characterization of the Multiple Forms of Human Skeletal Muscle Triosephosphate Isomerase. Biochim. Biophys. Acta (1980) 614, 173-184

ECKHARDT, A.E., C.E. HAYES and I.J. GOLDSTEIN: A Sensitive Fluorescent Method for the Detection of Glycoproteins in Polyacrylamide Gels. Anal. Biochem. (1976) 73, 192-197

ELLIS, R.J., St.M. SMITH and R. BARRACLOUGH: Nuclear-Plastid Interactions in Plastid Protein Synthesis. Proc. of the Fourth John Innes Symposium (1979) S.147-160

FEIERABEND, J. and A. PIRSON: Die Wirkung des Lichts auf die Bildung von Photosyntheseenzymen in Roggenkeimlingen. Z.Planzenphysiol. (1966) 55, 235-245

FEIERABEND, J., CH. BERGER und A. MEYER: Spezifische Störung von Entwicklung und Enzymbildung der Plastiden höherer Pflanzen durch hohe Wachstumstemperaturen. Z.Naturforsch. (1969) 24b, 1641-1647

FEIERABEND, J.: Developmental Studies on Microbodies in Wheat Leaves. III. On the Photocontrol of Microbody Development. Planta (1975) 123, 63-77

FEIERABEND, J. and U. SCHRADER-REICHHARDT: Biochemical Differentiation of Plastids and Other Organelles in Rye Leaves with a High-Temperature-induced Deficiency of Plastid Ribosomes. Planta (1976) 129, 133-145

FEIERABEND, J. and M. MIKUS: Occurence of a High Temperature Sensitivy of Chloroplast Ribosome Formation in Several Higher Plants. Plant Physiol. (1977) 59, 863-867

FEIERABEND, J. and G. WILDNER: Formation of the Small Subunit in the Absence of the Large Subunit of Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase in 70s Ribosome Deficient Rye Leaves. Arch. Biochem. Biophys. (1978) 186, 283-291

FEIERABEND, J.: Role of Cytoplasmic Protein Synthesis and its Coordination with the Plastidic Protein Synthesis in the Biogenesis of Chloroplasts. Ber. Deutsch. Bot. Ges. (1979) 92, 553-574

FLORKIN, M. and E.H. STOTZ: Enzyme Nomenclature. Comprehensive Biochemistry (1973) 13, 301-315

GERHARDT, B. and H. BEEVERS: Influence of Sucrose on Protein Determination by the Lowry Procedure. Anal. Biochem. (1968) 24, 337-339

GIBSON, J.L. and F.R. TABITA: Different Molecular Forms of D-Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase from RHODOPSEUDOMONAS sphaeroides. J. Biol. Chem. (1977) 252, 943-949

GLOSSMANN, H. and D.M. NEVILLE: Glycoproteins of Cell Surfaces. A Comparative Study of Three Different Cell Surfaces of the Rat. J. Biol. Chem. (1971) 246, 6339-6346

GRABAR, P. and C.A. WILLIAMS: Méthode permettant l'étude conjugée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. Biochim. Biophys. Acta (1953) 10, 193-194

GRACY, R.W.: Nature of the Multiple Forms of Glucosephosphate and Triosephosphate Isomerases. aus: Isozymes, Molecular Structure, Ed. C.L. Markert, Vol.1, S.471-487, 1975

GREEN, A.A. and W.L. HUGHES: Protein Fractionation on the Basis of Solubility in Aqueous Solutions of Salts and Organic Solvents. Methods in Enzymology (1955) 1, 67-90

GRIERSON, D.. Light-Stimulated Accumulation of 14s RNA During Chloroplast Development in Spinach Cotyledons. Z. Pflanzenphysiol. (1979) 95, 171-177

GROSS, E.: The Cyanogen Bromide Reaction. Methods in Enzymology (1967) 11, 238-255

HAAR, F. VON DER: Purification of Proteins by Fractional Interfacial Salting Out on Unsubstituted Gels. Biochem. Biophys. Res. Com. (1976) 70, 1009-1013

HACKERT, M.L., B.A. HARRIS and L.L. POULSEN: Purification and Crystallization of $NADP^+$-Specific Isocitrate Dehydrogenase From ESCHERICHIA coli Using Polyethylene Glycol. Biochim. Biophys. Acta (1977) 481, 340-347

HAGER, D.A. and R.R. BURGESS: Elution of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate, and Renaturation of Enzymatic Activity: Results with Sigma Subunit of ESCHERICHIA coli RNA Polymerase, Wheat Germ DNA Topoisomerase, and Other Enzymes. Anal. Biochem. (1980) 109, 76-86

HARBOE, N. and A. INGILD: Immunization, Isolation of Immunoglobulins, Estimation of Antibody Titre. Scand. J. Immunol. (1973) 2, 161-164

HEIL, J.A. and H.G. LEBHERZ: "Hybridization" between Aldolase Subunits Derived from Mammalian and Plant Origin. J. Biol. Chem. (1978) 253, 6599-6605

HEIJNE, G. VON and C. BLOMBERG: Trans-membrane Translocation of Proteins. Eur. J. Biochem. (1979) 97, 175-181

HERRMANN, R.G. and J. FEIERABEND: The Presence of DNA in Ribosome-Deficient Plastids of Heat-Bleached Rye Leaves. Eur. J. Biochem. (1980) 104, 603-609

HOUMARD, J. and G.R. DRAPEAU: Staphylococcal Protease: A Proteolytic Enzyme Specific for Glutamoyl Bonds. Proc. Nat. Acad. Sci. (1972) 69, 3506-3509

IUPAC-IUB: Nomenclature of Multiple Forms of Enzymes. Commission of Biochemical Nomenclature (CBN). J. Biol. Chem. 252, 5939-5941 (1977)

JOHNSON, L.N. and S.G. WALEY: Preliminary Crystallographic Data for Triose Phosphate Isomerase. J. Mol. Biol. (1967) 29, 321-322

KABAT, E.A.: Einführung in die Immunchemie und Immunologie. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1971

KESTER, M.V., E.L. JACOBSON and R.W. GRACY: The Synthesis of a Labile Triosephosphate Isomerase Isoenzyme in Human Lymphoblasts and Fibroblasts. Arch. Biochem. Biophys. (1977) 180, 562-569

KILTZ, H.-H., KEIL, W., GRIESBACH, M., PETRY, K. und MEYER, H.: The Primary Structure of Porcine Lactate Dehydrogenase: Isoenzymes M_4 and H_4. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. (1977) 358, 123-127

KIRKEGAARD, L.H.: Gradient Sievorptive Chromatography. A Focusing System for the Separation of Cellular Components. Biochemistry (1973) 12, 3627-3632

KITTO, G.B., P.M. WASSARMAN and N.O. KAPLAN: Enzymatically Active Conformers of Mitochondrial Malate Dehydrogenase. Proc. Nat. Acad. Sci. (1966) 56, 578-585

KREIL, G.: Transfer of Proteins Across Membranes. Ann. Rev. Biochem. (1981) 50, 317-348

KRIETSCH, W.K.G., P.G. PENTCHEV, W. MACHLEIDT und H. KLINGENBURG: The Composition of the Rabbit Muscle Triosephosphate Isomerase Isozymes of Two Different Subunits. FEBS Letters (1970a) 11, 137-139

KRIETSCH, W.K.G., P.G. PENTCHEV, H. KLINGENBURG, T. HOFSTÄTTER and TH. BÜCHER: The Isolation and Crystallization of Yeast and Rabbit Liver Triose Phosphate Isomerase and a Comparative Characterization with the Rabbit Muscle Enzyme. Eur. J. Biochem. (1970b) 14, 289-300

KURZOK, H.-G.: Vergleich cytoplasmatischer und plastidärer Isoenzyme. Diplomarbeit 1977, Ruhr-Universität-Bochum

LAEMMLI, U.K.: Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature (1970) 227, 680-685

LAURELL, C.-B.: Antigen - Antibody Crossed Electrophoresis. Anal. Biochem. (1965)) 10, 358-361

LEONG, T.-Y. und H.-G. SCHWEIGER: The Role of Chloroplast-Membrane Protein Synthesis in the Circadian Clock. Eur. J. Biochem. (1979) 98, 187-194

LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL: Proteinmeasurement with the Folin Phenolreagent. J. Biol. Chem. (1951) 193, 265-275

MA, Y., F.A. BLISS and T.C. HALL: Peptide Mapping Reveals Considerable Sequence Homology Among the Three Polypeptide Subunits of Gl Storage Protein from French Bean Seed. Plant Physiol. (1980) 66, 897-902

MANCINI, G., CARBONARA, A.O. and J.F. HEREMANS: Immunochemical Quantitation of Antigens by Single Radial Immunodiffusion. aus: Immunochemistry 2, 253-354, 1965 Oxford, Pergamon Press

MARKERT, C.L. und F. MOLLER: Multiple Forms of Enzymes: Tissue, Ontogenetic and Species Specific Patterns. Proc. Nat. Acad. Sci. (1959) 45, 753-763

MARKERT, C.L.: Isozymes: The Development of a Concept and Its Applications. aus: Isozymes - Current Topics in Biological and Medical Research, Eds. M.C. Rattazzi, J.G. Scandalios und G.S. Whitt (1977) 1, 1-17

MARTIN, R.G. and B.N. AMES: A Method for Determining the Sedimentation Behavior of Enzymes: Application to Protein Mixtures. J. Biol. Chem. (1961) 236, 1372-1379

MAURER, H.R.: Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis. W. de Gruyter, Berlin, New York, 1971

MEYERHOF, O. und W. KIESSLING: Über die enzymatische Umwandlung von Glycerinaldehydphosphorsäure in Dioxyacetonphosphorsäure. Biochem. Z. (1935) 279, 40-48

MO, Y.,B.G. HARRIS and R.W. GRACY: Triosephosphate Isomerases and Aldolases from Light- and Dark-Grown EUGLENA gracilis. Arch. Biochem. Biophys. (1973) 157, 580-587

MOHAMED, A.H. and L.E. ANDERSON: Extraction of Chloroplast Light Effect Mediator(s) and Reconstitution of Light Activation of NADP-Linked Malate Dehydrogenase. Arch. Biochem. Biophys. (1981) 209, 606-612

MOHR, H.: Licht und Entwicklung - das Phytochromsystem der Pflanzen. Naturwissenschaften (1981) 68, 193-200

MÜLLER, B., ZIEGLER, I. und H. ZIEGLER: Lichtinduzierte reversible Aktivitätssteigerung der NADP-abhängigen Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase in Chloroplasten. Eur. J. Biochem. (1969) 9, 101-106

NAGAHASHI, J. and L. BEEVERS: Subcellular Localization of Glycosyl Trasferases Involved in Glycoprotein Biosynthesis in the Cotyledons of Pisum sativum L. Plant Physiol. (1968) 61, 451-459

NEILANDS, J.B.: The Purity of Lactic Dehydrogenase. Science (1952) 115, 143-144

NELSON, J.W., W.B. ALLINGTON and C.G. ARON: Isoelectric Focusing with ISCO Density Electrophoresis Equipment. ISCO Appl. Res. Bulletin No.15, 1974

NIKODEM, V. and J.R. FRESCO: Protein Fingerprinting by SDS-Gel Electrophoresis after Partial Fragmentation with CNBr. Anal. Biochem. (1979) 97, 382-386

NOLTMANN, E.A.: Aldose-Ketose Isomerases. VII. Triosephosphate Isomerase. The Enzymes VI, 326-340, 1972

ONISHI, H.R., J.S. TKACZ, and J.O. LAMPEN: Glycoprotein Nature of Yeast Alkaline Phosphatase. J. Biol. Chem. (1979) 254, 11943-11953

OUCHTERLONY, Ö.: Diffusion in Gel. Methods for Immunological Analysis. II. Progress in Allergy VI, 30-154, 1962

PACOLD, I. and L.E. ANDERSON: Chloroplast and Cytoplasmic Enzymes. VI. Pea Leaf 3-Phosphoglycerate Kinases. Plant Physiol. (1975) 168-171

PONTIER, P.J. and N.H. Hart: Developmental Expression of Glucose and Triose Phosphate Isomerase Genes in Teleost Fishes (Brachydanio). J. Exp. Zool. (1981) 217, 53-71

PRAGER,E.M. and A.C. WILSON: The Dependence of Immunological Cross-Reactivity upon Sequence Resemblance among Lysozymes. J. Biol. Chem. (1971) 246, 7010-7017

PROUTY, W.F. and A.L. GOLDBERG: Effects of Protease Inhibitors on Protein Breakdown in Escherichia coli. J. Biol. Chem. (1972) 247, 3341-3352

RACUSEN, D.: Glycoprotein Detection in Polyacrylamide Gel with Thymol and Sulferic Acid. Anal. Biochem. (1979) 99, 474-476

REYNOLDS, J.A. and CH. TANFORD: Binding of Dodecyl Sulfate to Proteins at High Binding Ratios. Possible Implications for the State of Proteins in Biological Membranes. Proc. Nat. Acad. Sci. (1970) 66, 1002-1007

RIESE, F.-W.: Trennung, subzelluläre Lokalisierung und Entwicklung von Isoenzymen der Triosephosphat Isomerase aus Blättern von Roggenkeimlingen. Staatsexamensarbeit Ruhr-Universität Bochum 1976

RUTTER, W.J., T. RAJKUMAR, E. PENHOET, M. KOCHMAN and R. VALENTINE: Aldolase Variants: Structure and Physiological Significance. Ann. N.Y. Acad. Sci. (1968) 151, 102-117

SAHEKI, S., K. SAHEKI and T. TANAKA: Peptide Mapping by Limited Proteolysis of Four Pyruvate Kinase Isozymes. FEBS Letters (1978) 93, 25-28

SAWYER, TH.H., B.E. TILLEY and R.W. GRACY: Studies on Human Triosephosphate Isomerase. II. Nature of the Electrophoretic Multiplicity in Erythrocytes. J. Biol. Chem. (1972) 247, 6499-6505

SCANDALIOS, J.G.: Isozymes in Development and Differentiation. Ann. Rev. Plant Physiol. (1974) 25, 225-258

SCANDALIOS, J.G.: Isozymes: Genetic and Biochemical Regulation of Alcohol Dehydrogenase. aus: Phytochemical Society Symposia Series No.14: Regulation of Enzyme Synthesis and Activity in Higher Plants. Ed. H. Smith (1977) S.129-153

SCHÄFERS, H.-A. and J. FEIERABEND: Ultrastructural Differentiation of Plastids and Other Organelles in Rye Leaves with a High-Temperature-induced Deficiency of Plastid Ribosomes. Cytobiol. (1976) 14, 75-90

SCHNARRENBERGER, C. and A. OESER: Two Isoenzymes of Glucosephosphate Isomerase from Spinach Leaves and Their Intracellular Compartmentation. Eur. J. Biochem. (1974) 45, 77-82

SCHNARRENBERGER, C., A. OESER and N.E. TOLBERT: Two Isoenzymes Each of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase and 6-Phosphogluconate Dehydrogenase in Spinach Leaves. Arch. Biochem. Biophys. (1973) 154, 438-448

SCHNARRENBERGER, C., M. TETOUR and M. HERBERT: Development and Intracellular Distribution of Enzymes of the Oxidative Pentose Phosphate Cycle in Radish Cotyledons. Plant Physiol. (1975) 56, 836-840

SCHNEIDER, V. und U.W. HALLIER: Polyvinylpyrrolidon als Schutzstoff bei der Untersuchung gerbstoffgehemmter Enzymreaktionen. Planta (1970) 94, 134-139

SCHOPFER, P.: Phytochrome Control of Enzymes. Ann. Rev. Plant Physiol. (1977) 28, 223-252

SCOPES, R.K.: Methods for Starch-Gel Electrophoresis of Sarcoplasmic Proteins: An Investigation of the Relative Mobilities of the Glycolytic Enzymes from the Muscles of a Variety of Species. Biochem. J. (1968) 107, 139-150

SEGREST, J.P. and R.L. JACKSON: Molecular Weight Determination of Glycoproteins by Polyacrylamide Gel Electrophoresis in Sodium Dodecyl Sulfate Methods in Enzymology (1972) 28, 54-63

SHARON, N. and H. LIS: Glycoproteins: Research Booming on Long-ignored, Ubiquitous Compounds. Chemical and Engineering News (1981) 30, 21-44

SIEGEL, L.M. and K.J. MONTY: Determination of Molecular Weights and Frictional Ratios of Proteins in Impure Systems by Use of Gel Filtration and Density Gradient Centrifugation. Application to Crude Preparations of Sulfite and Hydroxylamine Reductases. Biochim. Biophys. Acta (1966) 112, 346-362

SIMCOX, P.D. and D.T. DENNIS: Isoenzymes of the Glycolytic and Pentose Phosphate Pathways in Proplastids from the Developing Endosperm of RICINUS communis L. Plant Physiol. (1978) 61, 871-877

SMILLIE, R.M. and N.S. SCOTT: Organelle Biosynthesis: The Chloroplast in: Progress in Molecular and Subcellular Biology Vol.1, S.136-202, 1969 Ed. F.E. Hahn, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

SMITH, ST.M. and R.J. ELLIS: Processing of Small Subunit Precursor of Ribulose Bisphosphate Carboxylase and its Assembly into Whole Enzyme are Stromal Events. Nature (1979) 278, 662-664

SNAPKA, R.M., T.H. SAWYER, R.A. BARTON and R.W. GRACY: Comparison of the Electrophoretic Properties of Triosephosphate Isomerases of Various Tissues and Species. Comp. Biochem. Physiol (1974) 49B, 733-741

TOMLINSEN, J.D. and J.F. TURNER: Pea Seed Triose Phosphate Isomerase. Phytochemistry (1979) 18, 1959-1962

TURNER, D.H., E.S. BLANCH, M. GIBBS and J.F. TURNER: Triosephosphate Isomerase of Pea Seeds. Plant Physiol. (1965) 40, 1146-1150

VESTERBERG, O.: Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels. Electrofocusing and Isotachophoresis. Eds. Radola and Graessling, W. de Gruyter, 1977, S.123-134

WALK, R.-A. and B. HOCK: Glyoxysomal and Mitochondrial Malate Dehydrogenase of Watermelon (CITRULLIS vulgaris) Cotyledons. II. Kinetic Properties of the Purified Isoenzymes. Planta (1977) 136, 221-228

WEBER, K. and M. OSBORN: The Reliability of Molecular Weight Determination by Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis. J. Biol. Chem. (1969) 244, 1029-1041

WERDAN, K., H.W. HELDT and M. MILOVANCEW: The Role of pH in the Regulation of Carbon Fixation in the Chloroplast Stroma. Studies on CO_2 Fixation in the Light and Dark. Biochim. Biophys. Acta (1975) 396, 276-292

WILP, R. und R. BUSCHBECK: Veränderungen der Isoenzymmuster der Amylasen in Karyopsen von Winterroggen, Secale cereale, während der Reifung und Keimung. Biochem. Physiol. Pflanzen (1978) 173, 270-278

WU, R. and E. RACKER: Regulatory mechanism in carbohydrate metabolism. J. Biol. Chem. (1959) 234, 1029-1035

WÜRZBURG, U.: Analyse von Enzymsystemen mit hemmenden Antikörpern. Kontakte (1978) 3, 10-17

YUAN, P.M., R.N. DEWAN, M. ZAUN, R.E. THOMPSON and R.W. GRACY: Isolation and Characterization of Triosephosphate Isomerase Isozymes from Human Placenta. Arch. Biochem. Biophys. (1979) 198, 42-52

ZACHARIUS, R.M., T.E. ZELL, J.H. MORRISON and J.J. WOODLOCK: Glycoprotein Staining following Electrophoresis on Acrylamide Gels. Anal. Biochem. (1969) 30, 148-152

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. J. Feierabend durchgeführt. Für die Überlassung des Themas, die vielseitigen Anregungen und die ständige Anteilnahme an allen wissenschaftlichen Fragen sei an dieser Stelle herzlich gedankt.

Herrn H. Winking möchte ich meinen Dank für die Herstellung der Abbildungen aussprechen.

Die Arbeit wurde durch Sachbeihilfen der Deutschen Forschungsgemeinschaft an Herrn Prof. Dr. J. Feierabend unterstützt.

LEBENSLAUF

9.10.1949	geboren in Düsseldorf als Sohn des Betriebsleiters Georg Kurzok und seiner Ehefrau Josefine, geb. Nitsche
1956-1960	Besuch der Grundschule in Düsseldorf
1960-1969	Besuch des alt- und neusprachlichen Comenius-Gymnasiums in Düsseldorf
1970	Reifeprüfung am neusprachlichen Rethel-Gymnasium in Düsseldorf
1970-1972	Bundeswehrdienst
1972-1977	Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
1978	Erlangung des akademischen Grades Diplom-Biologe und Beginn der Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. J. Feierabend
1978	Wissenschaftliche Hilfskraft in der AG Pflanzliche Zellphysiologie von Prof. Dr. J. Feierabend
1978-1980	Wissenschaftlicher Angestellter (m.d. V.b.) in der AG Pflanzliche Zellphysiologie von Prof. Dr. J. Feierabend
1980	Wechsel zur Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt und Tätigkeit als Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Fachbereich Biologie

D. GRÄBNER
DISSERTATIONS U. OFFSETDRUCKEREI

Gotenstraße 3
8602 Altendorf bei Bamberg
Telefon: 09545 /8791